

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE ANGÉLICA POMMERENING FINGER

ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Leptospira* spp. EM CAVALOS
CARROCEIROS DE CURITIBA E PINHAIS, PR.

CURITIBA

2012

MARIANE ANGÉLICA POMMERENING FINGER

ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Leptospira* spp. EM CAVALOS
CARROCEIROS DE CURITIBA E PINHAIS, PR.

Dissertação apresentada ao Programa De Pós Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade
Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.
Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Peterson Triches Dornbusch

CURITIBA

2012

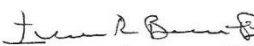
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

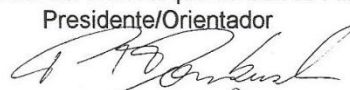


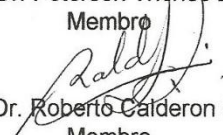
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Leptospira* spp. EM CAVALOS CARROCEIROS DE CURITIBA E PINHAIS, PR”** apresentada pela Mestranda **MARIANE ANGÉLICA POMMERENING FINGER** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata Aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 5 de março de 2012


Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Presidente/Orientador


Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch
Membro


Professor Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Membro

*Á Deus e a minha família,
A todos que acreditaram no meu potencial
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele eu jamais conseguiria.

Ao meu orientador, professor doutor Ivan Roque de Barros Filho, por ter me aceito como orientada e ter direcionado a pesquisa, estando sempre atento as minhas necessidades enquanto mestranda.

Ao professor doutor Peterson Triches Dornbush, meu co-orientador por todo o aporte técnico a mim prestado, especialmente a paciência para me explicar a estatística a ser aplicada.

Professor doutor Ivan Deconto e professor doutor Alexander Welker Biondo, coordenadores do projeto de extensão universitária Carroceiro, por terem permitido que o projeto de pesquisa fosse desenvolvido junto ao projeto de extensão.

Agradecimento especial ao professor doutor Alexander Welker Biondo por todas as dicas e os puxões de orelha.

Aos professores membros do comitê de orientação, professor doutor Marcelo Beltrão Molento e professora doutora Rosângela Locatelli Dittrich pelas considerações feitas com relação ao projeto de pesquisa.

Aos professores doutores Geraldo Camilo Alberton e Alexander Welker Biondo, pela participação no exame de qualificação e colaboração com seus apontamentos.

Ao doutor Jean Chiotti, diretor geral da Idexx Reference Laboratories na América Latina, doutor Christian Leutenegger, diretor da Real Time Core Facility e Marko Strada da Idexx Laboratories em Davis – CA, pelo processamento das amostras e esclarecimento das dúvidas com relação à técnica de PCR em tempo real.

A Aline Baumann, do Clinilab, pelo auxílio no envio das amostras.

A toda equipe do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses da Universidade Estadual Paulista de Botucatu – SP, especialmente ao Professor Doutor Hélio Langoni e a residente Mariana Kikuti pelo processamento das amostras.

A amiga Leila Sabrina Ullmann, por todas as broncas, todo o apoio e a hospitalidade com que me recebeu em sua casa quando visitei Botucatu-SP. Agradeço também a imensa ajuda com o artigo de qualificação.

As alunas de iniciação científica Ana Paula Marinho e Mariana Yumi Takahashi Kamo, pelo auxílio nas coletas, elaboração de gráficos e tabelas, idéias e companheirismo.

Aos colegas médicos veterinários Thais Gislon da Silva, Eduarda Maria Oliveira, João Perotta e Ana Paula Brenner Busch pelo auxílio nas coletas.

A todos os alunos participantes do projeto Carroceiro, por possibilitarem a realização desta pesquisa e por terem compreendido meu comportamento autoritário nos momentos de tensão.

A amiga Mardjory Basten que, mesmo sem qualquer obrigação, ficava comigo até tarde no laboratório aliquotando amostras depois de cada Dia do Carroceiro, sem faltar um.

A doutoranda Vivien Midori Morikawa, por intermediar as coletas na Vila Pantanal e permitir a realização das coletas juntamente com sua pesquisa.

A dona Fátima, que foi minha guia na Vila Pantanal.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Pinhais, especialmente a médica veterinária Cristiane de Conceição Barros e Raquel Pampuch, pelo suporte logístico prestado ao projeto Carroceiro e, conseqüentemente, a esta pesquisa.

Ao REUNI pela bolsa de mestrado a mim concedida.

A UFPR, por toda estrutura de laboratórios e transporte cedida para a realização da pesquisa.

Agradecimento especial a todos os proprietários de cavalos carroceiros, que permitiram a realização das coletas em seus animais.

Aos meus familiares, especialmente meus pais Valmir e Edith e irmãos Márcio e Michele, que me apoiaram e suportaram todo o nervosismo, a ausência e estresse nos dias de tensão.

Ao meu noivo Francis, por toda a paciência e amor a mim dedicados.

A todos que colaboraram, diretamente ou indiretamente, com essa pesquisa.

A banca examinadora desta dissertação.

“O carroceiro, Homem – Cavalo, puxa carroça pela rua
Será que dá dinheiro esse monturo de plásticos, papéis, cacos e sucatas?

O carroceiro, Cavalo – Homem, chafurdou lixeiras, caçambas
Em busca de metais, latas, restos de carros alegóricos
Criou um mundo brasileiro que carrega às suas costas

Lá vai o carroceiro, trotando, subindo ladeira

Passando entre os carros

Os olhos ardem, o estômago pesa, engole fumaça

Tudo nebuloso em meio ao chuveiro

(...)

Lá vai o carroceiro, disputa espaço entre as buzinas e as guinadas,

Ouve estranhas risadas que sobem dos bueiros

(...)

Alguém quase o atropela, xinga-o de maconheiro

Ele cospe saliva verde, ruma tristeza:

De quem será herdeiro?

Do homem?

Do cavalo?

Do tráfico negreiro?

Puxa carroça, carroceiro.”

Raquel Naveira

Carroceiro

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose reemergente de distribuição mundial e endêmica no Brasil. É causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira* e quase todos os mamíferos têm sido demonstrados como carreadores. Em cavalos, a leptospirose geralmente é assintomática, mas abortamentos, uveíte recorrente e outros sinais sistêmicos podem estar presentes. Muitos cavalos carroceiros, que não tem acesso a cuidados veterinários, são utilizados no recolhimento de material reciclável. Os animais circulam por Curitiba e região metropolitana e, na maioria das vezes, são mantidos em condições sanitárias precárias. Primeiramente, apresenta-se um capítulo de revisão sobre os principais aspectos da leptospirose em cavalos. Posteriormente, relatam-se dois estudos realizados com cavalos carroceiros, envolvendo sorologia e diagnóstico molecular para leptospirose. O primeiro foi realizado em Pinhais – PR, cidade da região metropolitana de Curitiba, onde foram coletadas 153 amostras de soro, 29 de sangue total e 19 de urina. Prevalência de 15,03% (23/153) foi observada pela SAM e nenhuma amostra de sangue e urina foi positiva pela qPCR. Os sorovares mais frequentes foram Pomona e Canicola. Não houve diferença entre gênero e idade de animais reagentes e não reagentes. O segundo estudo foi realizado na Vila Pantanal, bairro da capital paranaense onde enchentes e falta de saneamento básico tornam a área de risco para ocorrência de leptospirose. Foram coletadas 62 amostras de soro, 22 de sangue total e 22 de urina. A prevalência observada pela SAM foi de 75,8% (47/62) e nenhuma amostra de sangue e urina foi positiva pela qPCR. O sorovar mais prevalente foi o *Icterohaemorrhagiae*. Observou-se correlação positiva entre pluviosidade e sorologia para *Leptospira* spp. e que inundações constituem um risco para leptospirose em cavalos. Não houve correlação entre alterações nos exames laboratoriais e sorologia para leptospirose em nenhum dos estudos. Cavalos carroceiros podem servir de sentinelas para alertar sobre a presença de *Leptospira* spp. no ambiente urbano e mesmo, a ocorrência de surtos de leptospirose humana.

Palavras – chave: *Leptospira* spp., cavalos carroceiros, SAM, qPCR

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide reemerging zoonosis endemic in Brazil. It is caused by spirochetes bacteria of genus *Leptospira* and almost all mammals have been reported as carriers. In horses, leptospirosis is generally asymptomatic but abortions, recurrent uveitis and other systemic signs may occur. A lot of cart horses, that has no access to veterinary care, are used to carry recycle material. Animals go around Curitiba and surroundings and, the major times, are kept in bad health conditions. First, a review chapter about equine leptospirosis is introduced. Later, two studies with cart horses, involving serology and molecular diagnosis to leptospirosis, are shown. The first research was realized in Pinhais – PR, city of Curitiba metropolitan region, where 153 sera, 29 whole blood and 19 urine samples were collected. Prevalence of 15.03% (23/153) was observed by MAT and no blood and urine samples were positive by qPCR. The most frequent serovars were Pomona and Canicola. There was no difference between gender and age in regent and no reagent horses. The second research was realized at Vila Pantanal, Parana State capital district where flooding and lack of basic sanitation make this area a risk to leptospirosis. 62 sera, 22 whole blood and 22 urine samples were collected. Prevalence of 75.8% (47/62) was observed by MAT and no blood and urine samples were positive by qPCR. The most prevalent serovar was Icterohaemorrhagiae. Positive correlation between rainfall and serology to *Leptospira* spp. was observed and flooding is a risk to leptospirosis occurrence in horses. There was no relation between laboratorial tests disturbance and serology to leptospirosis in both researches. Cart horses may be sentinels to make an alert about presence of *Leptospira* spp. in urban environment and even, human leptospirosis outbreaks.

Key – words: *Leptospira* spp., cart horses, MAT, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 01- Prevalência de <i>Leptospira</i> spp. de acordo com o estado brasileiro.....	24
GRÁFICO 01- Sorologia para <i>Leptospira</i> spp. de acordo com sorovar em cavalos carroceiros no município de Pinhais – PR, 2012.	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Sorologia para <i>Leptospira</i> spp. de cavalos carroceiros no município de Pinhais – PR, 2012.....	41
TABELA 02 - Prevalência de <i>Leptospira</i> spp.de acordo com o sorovar, Curitiba – PR, 2012.....	56
TABELA 03 – Titulação para <i>Leptospira</i> spp. dos animais que participaram de mais de uma coleta, Curitiba, PR,2012.....	57
TABELA 04 - Questionário epidemiológico para <i>Leptospira</i> spp. em 22 cavalos carroceiros de Curitiba – PR, Brasil, 2011.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

g/dL	gramas por decilitro
HPIE	hemorragia pulmonar induzida por exercício
Ht	hematócrito
INMET	Instituto Nacional de Metereologia
MAT	Microscopic Agglutination Test
µm	micrometro
mg	miligrama
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCV	packed cell volume
PPT	proteína plasmática total
PR	Paraná
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
RS	Rio Grande do Sul
SAM	soro aglutinação microscópica
Spp	espécies
Sp	espécie
SSTF	solução salina tamponada de fosfatos
SINAN	sistema de informação de agravos de notificação
TPP	total plasmatic protein
UI	unidade internacional
VG	volume globular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 HIPÓTESE	15
1.2 OBJETIVO GERAL	15
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
REFERÊNCIAS	17
2 LEPTOSPIROSE EM CAVALOS: ATUALIZAÇÃO	19
2.1 RESUMO	19
2.2 ABSTRACT	19
2.3 INTRODUÇÃO	19
2.4 ETIOLOGIA	20
2.5 EPIDEMIOLOGIA : PREVALÊNCIA NO BRASIL E NO MUNDO	20
2.6 SINAIS CLÍNICOS	25
2.7 DIAGNÓSTICO	26
2.8 TRATAMENTO	27
2.9 PROFILAXIA	28
REFERÊNCIAS	29
3 LEPTOSPIRA SPP. EM CAVALOS CARROCEIROS DO MUNICÍPIO DE PINHAIS PR	36
3.1 RESUMO	36
3.2 ABSTRACT	36
3.3 INTRODUÇÃO	37
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
4 INQUÉRITO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE LEPTOSPIRA SPP. EM CAVALOS CARROCEIROS DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEPTOSPIROSE HUMANA EM CURITIBA, SUL DO BRASIL	50
4.1 RESUMO	50
4.2 ABSTRACT	50
4.3 INTRODUÇÃO	51
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

6 APÊNDICES.....	65
6.1 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. NA VILA PANTANAL.....	65
6.2 PREVALÊNCIA DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. EM CAVALOS CARROCEIROS EM PINHAIS E CURITIBA- PR, 2012.....	66
6.3 CASOS HUMANOS DE LEPTOSPIROSE CONFIRMADOS E ÓBITOS NO PERÍODO DE 2009 A 2011 NO PARANÁ,2012.....	66
6.4 FOTO DA VILA PANTANAL, CURITIBA, PR.....	67
6.5 FOTO DA VILA PANTANAL, CURITIBA,PR.....	67
6.6 QUADRO COM SAM E QPCR PARA <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. DE CAVALOS CARROCEIROS DE PINHAIS – PR, 2012.....	68
6.7 QUADRO COM SAM E QPCR PARA <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. DE CAVALOS CARROCEIROS DE CURITIBA– PR, 2012.....	72
7 ANEXOS.....	75

INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com roedores desempenhando importante papel como reservatório para o ciclo de *Leptospira* spp. e sua manutenção em áreas urbanas de países tropicais (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). A doença é endêmica no Brasil com de 12.226 casos humanos confirmados entre os anos de 2009 e 2011, com 9,30% de mortalidade. O estado do Paraná apresentou o quinto maior número de casos do país nesse período (939), ficando atrás apenas de São Paulo (2577), Santa Catarina (1535), Rio Grande do Sul (1442) e Rio de Janeiro (1005) (SINAN, 2012). Os municípios onde o presente estudo foi realizado, Curitiba e Pinhais, somam, respectivamente, 364 e 23 casos confirmados. Juntos, representam 41,21% dos casos ocorridos no estado do Paraná entre 2009 e 2011.

A leptospirose é causada por bactéria espiroqueta da família Leptospiraceae, Gênero *Leptospira* (QUINN et al., 2005) e quase todos os mamíferos têm sido demonstrados como carreadores de *Leptospira* sp. (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). A transmissão de *Leptospira* sp. entre seres humanos praticamente não ocorre, sempre havendo a necessidade de um animal para transmissão (WHO, 2003). A infecção por leptospirose em cavalos, embora normalmente assintomática, tem sido associada à uveíte recorrente equina, abortamentos e outros sinais sistêmicos (PESCADOR et al., 2004; PIRES NETO et al., 2005). Em estudo com infecção experimental por *Leptospira* spp. os cavalos apresentaram leptospirose de 2 a 6 dias após a infecção e leptospirose 4 semanas após a infecção, demonstrando que o cavalo pode disseminar a doença (YAN et al., 2010).

Muitos cavalos carroceiros, que não tem acesso a cuidados veterinários, são utilizados no recolhimento de material reciclável. Os animais circulam por Curitiba e região metropolitana e, na maioria das vezes, são mantidos em condições sanitárias ruins. Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias e de infraestrutura são precárias, junto a lixões, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados, proximidade com outras espécies animais, se constituem particularmente em população de risco para leptospirose (BARWICK et al., 1997).

O padrão ouro para o diagnóstico de leptospirose é a soro aglutinação microscópica (SAM), que detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* spp. (WHO, 2003). Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) pode ser usado para detectar ácidos nucleicos de leptospirosas patogênicas, através do gene da proteína LipL32, presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* spp. (STODDARD et al.; 2009). A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem se demonstrado uma ferramenta rápida e definitiva no diagnóstico que deveria ser mais utilizada para esclarecer casos suspeitos de leptospirose (PINNA et al., 2011).

Esta dissertação divide-se em três capítulos: o primeiro é uma revisão de literatura sobre os principais aspectos da leptospirose equina; o segundo demonstra os resultados obtidos no estudo sorológico e molecular no município de Pinhais; o terceiro demonstra os resultados obtidos no estudo sorológico e molecular na capital paranaense.

1.1 HIPÓTESE

A hipótese é de que os cavalos de tração utilizados na coleta de material reciclável em Curitiba e Pinhais possam estar sendo infectados por *Leptospira* sp. pelas condições dos locais em que se encontram e seu estado imunológico. Como há casos humanos, espera-se que os cavalos apresentem alguma prevalência e, possivelmente, leptospiúria e leptospiemia, uma vez que, especialmente no meio urbano, pessoas e animais dividem o mesmo ambiente.

1.2 OBJETIVO GERAL

Observar a ocorrência de leptospirose em cavalos utilizados para tração de carroças de coletores de material reciclável em Curitiba e Pinhais, Paraná.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a frequência de *Leptospira* spp em cavalos carroceiros através de método sorológico (soroaglutinação microscópica).
- 2- Observar a ocorrência de leptospiremia e leptospirúria em animais reagentes para *Leptospira* spp. através do método reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em amostras de sangue e urina.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A de La Peña. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. v.140, p. 287-296, 2010.

BARWICK RS, MOHAMMED HO, MCDONOUGH PL, WHITE ME. Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p.1097-1103, 1997.

PESCADOR CA, CORBELLINI LG, LORETTI AP, WUNDER E, FRANTZ FJ, DRIEMEIER D. *Leptospira* sp. as a cause of equine abortion. **Ciência Rural**, v.34, n.1, 271-4, 2004.

PIRES NETO, J.A.S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M.A.M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**. v. 2, p.165-176,2005.

PINNA, A. E.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. Molecular diagnosis of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.413, 2011.

QUINN, P. J. MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Espiquetas. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed.Artmed, p.179-189, 2005 .

Secretaria do Estado da Saúde do Paraná/ SESA-PR. Divisão de Zoonoses. **Banco de Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação / SINAN 2012**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

STODDARD, R.A.; GEEA, J.E.; WILKINSA, P.P.;MCCAUSTLANDB, K.; HOFFMASTERA, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 64, p.247-55, 2009

YAN, W.; FAISAL, S.M.; DIVERS, T.; McDONOUGH, S.P.; AKEY, B.; CHANG, Y.F. Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kinnewicki Infection of Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, n. 4, p. 912-7, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Disponível em: www.who.int

2. LEPTOSPIROSE EM CAVALOS: ATUALIZAÇÃO

2.1 Resumo

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial tendo quase todos os mamíferos como prováveis carreadores. Geralmente a infecção nos cavalos é inaparente, podendo ocorrer problemas reprodutivos e oculares. Há diversos levantamentos sorológicos de leptospirose equina no Brasil e no mundo, demonstrando que sua ocorrência é alta no rebanho equino. Esta revisão trata dos principais aspectos da leptospirose em cavalos.

2.2 Abstract

Leptospirosis is a worldwide zoonosis that has almost all mammals as probable carriers. Frequently the infection is unapparent in horses, eye and reproductive problems may occur. There are several serological survey of equine leptospirosis in Brazil and other countries, showing that its occurrence is high in equine herd. This review discusses the main aspects of leptospirosis in horses.

2.3 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, considerada doença reemergente no século XXI (GRECO, 2001) e é causada por bactéria espiroqueta da família Leptospiraceae, Gênero *Leptospira* (QUINN et al., 2005). A infecção é comum em mamíferos selvagens e domésticos sendo que cavalos reagem a muitos sorogrupos prevalentes no ambiente, mas a infecção é inaparente na maioria dos casos (ACHA e SZYFRES, 2001). A infecção por leptospirosas em cavalos, embora normalmente assintomática, tem sido associada à uveíte recorrente equina, abortos e outros sinais sistêmicos (PESCADOR et al., 2004; PIRES NETO et al., 2005), podendo causar prejuízos econômicos para a equideocultura. Um estudo com infecção experimental de *Leptospira interrogans* sorovar Kinnewicki demonstrou que os cavalos apresentaram leptospiremia de 2 a 6 dias após a infecção e leptospirúria 4 semanas após a infecção, demonstrando que o cavalo pode disseminar a doença (YAN et al., 2010). O método diagnóstico mais preconizado para leptospirose é o teste de soro aglutinação microscópica (SAM) (WHO, 2003), que detecta anticorpos

contra os diversos sorovares de *Leptospira* sp. (ZIMMERMAN e CRISMAN, 2008). Levett et al (2005) realizaram a detecção de leptospirosas patogênicas em amostra de sangue e urina por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) de tempo real, utilizando a codificação do gene de membrana externa LipL32, que expressa a lipoproteína durante infecções em mamíferos (HAAKE, 2000). Leptospirosas já foram detectadas na urina de bovinos por PCR com especificidade de 100% para leptospirosas patogênicas (BOMFIM et al., 2008). Esta revisão trata dos principais aspectos da leptospirose em cavalos.

2.4 Etiologia

A leptospirose é causada por uma bactéria espiroqueta da família *Leptospiraceae* gênero *Leptospira*. As bactérias desse gênero são helicoidais móveis com extremidades em forma de gancho (QUINN et al., 2005). O diâmetro aproximado é entre 0,1 µm e 6 a 20 µm de comprimento (FAINE et al., 1999). O gênero *Leptospira* inclui espécies saprófitas e patogênicas (MOREY et al., 2006). Há duas classificações taxonômicas para o gênero: molecular, baseada no DNA, e sorológica, determinada por fatores antigênicos (CARTER e WISE, 2004), sendo mais de 250 soro variedades em 23 sorogrupos (PEROLAT et al., 1998). Anteriormente apenas duas espécies de *Leptospira* sp. eram reconhecidas: *L. interrogans* (patogênica) e *L. biflexa* (saprófita). Atualmente são reconhecidas pelo menos 09 espécies patogênicas: *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* e *L. weilii* (QUINN et al., 2005). A classificação sorológica atual permite a diferenciação entre mais de 260 sorovares de *L. interrogans* (DESVARS, CARDINALE e MICHAULT, 2011). As leptospirosas podem sobreviver em lagoas, superfícies com água, solos úmidos e lama quando as temperaturas ambientais são quentes (QUINN et al., 2005).

2.5 Epidemiologia: prevalência no Brasil e no mundo

Leptospiras patogênicas podem ficar nos túbulos renais proximais dos rins de carreadores e serem excretadas pela urina podendo contaminar solo, água de superfície, rios e córregos. Quase todos os mamíferos têm sido demonstrados como carreadores de *Leptospira sp.* (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Nos cavalos os sorotipos mais importantes são Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Canicola, que podem ser transmitidos por portadores que podem contaminar água, solo e alimentos (THOMASSIAN, 2005). Leptospiras são excretadas na urina de animais infectados. O cavalo pode se contaminar ingerindo água ou alimentos com *Leptospira spp.* ou permanecendo em locais úmidos ou com água contendo *Leptospira spp.* (PAVORD e PAVORD, 2007). Um estudo com infecção experimental de *Leptospira interrogans* sorovar Kinnewicki demonstrou que os cavalos apresentaram leptospiremia de 2 a 6 dias e leptospirúria 4 semanas após a infecção, demonstrando que o cavalo pode disseminar a doença (YAN et al., 2010). Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias e de infraestrutura são precárias, junto a lixões, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados, proximidade com outras espécies animais, se constituem particularmente em população de risco para leptospirose (BARWICK et al., 1997). Há diversos estudos sobre a prevalência de leptospirose em equinos através de inquéritos sorológicos no Brasil (AGUIAR et al., 2008; BRAGA et al., 2011; CHIARELI et al., 2008; HAMOND et al., 2011; GOMES et al., 2007; HASHIMOTO et al., 2007; LANGONI et al., 2004; LASTA et al., 2009; LINHARES et al., 2005; MACIEL et al., 2008; MARINHO et al., 2010; PINNA et al., 2010; PINNA, VARGES e LILENBAUM, 2008; PIRES NETO et al., 2005).

No sul do país observou-se a prevalência de 73,6% (92/125) cavalos reagentes utilizados na coleta de material reciclável na cidade de Porto Alegre– RS. Os sorovares mais frequentes foram Pomona (54,34%) e Icterohaemorrhagiae (52,17%) (LASTA et al., 2009). Também no Rio Grande do Sul observou-se prevalência de 74,5% (871/1169) sendo os sorovares mais frequentes Bratislava (19,9%) e Copenhageni (15,0%) (PIRES NETO et al., 2005). Em cavalos carroceiros de 13 bairros de Santa Maria – RS encontrou-se a prevalência de 100% (39/39) cavalos reagentes, destacando-se os sorovares Icterohaemorrhagiae (19,8%) e Bratislava (17,6%), com títulos de 1:100 a 1:800 (MACIEL et al., 2008). Na área urbana de Londrina- PR a prevalência obtida em cavalos carroceiros foi de 66,8%

(214/320), sendo *Icterohaemorrhagiae* (23,3%) e *Grippotyphosa* (13,1%) os sorovares mais prevalentes (HASHIMOTO et al., 2007). Na região metropolitana de Curitiba, também no Paraná, a prevalência de 33,0% (38/115) foi encontrada em cavalos carroceiros, sendo os sorovares mais prevalentes *Icterohaemorrhagiae* (76,3%) e *Canicola* (13,1%) (MARINHO et al., 2010).

Na região serrana do estado do Rio de Janeiro, foram reagentes 55,4% (82/148) dos cavalos situados na mesma propriedade que apresentava problemas reprodutivos frequentes e sujeita a inundações. Os sorovares mais encontrados foram Bratislava (48,6%) e *Icterohaemorrhagiae* (4,0%) (PINNA, VARGES e LILENBAUM, 2008). Em estudo realizado com cavalos de corrida com idade entre 4 e 8 anos e não vacinados no Jockey Club do Rio do Janeiro, observou prevalência de 53,8% (107/199), destacando os sorovares *Icterohaemorrhagiae* (74,8%) e Hardjo (8,5%) (BRAGA et al., 2011). Em estudo associando leptospirose e hemorragia pulmonar induzida por exercício (HPIE) no Rio de Janeiro, prevalência de 58,3% (49/84), todos reagentes para o sorovar Copenhageni sendo que animais reagentes apresentaram 4,26 vezes mais chance de ter hemorragia pulmonar (HAMOND et al., 2011). No Rio de Janeiro encontrou-se prevalência de 66,1% (240/363) em éguas de seis plantéis diferentes, sendo mais frequentes os sorovares Bratislava (38,1%) e *Icterohaemorrhagiae* (30,6%) (PINNA et al., 2010). Em Minas Gerais 5,9 % (381/6475) cavalos de propriedades rurais de várias regiões do estado reagiram na SAM, com Hardjo (3,0%) e Pomona (1,2%) como os sorovares mais prevalentes (CHIARELI et al., 2008). Nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás, a prevalência em cavalos de esporte e trabalho foi de 54% (754/1402), sendo 37,0% (520) reagentes para *Icterohaemorrhagiae* sendo mais reagentes cavalos de trabalho do que os de esporte (LANGONI et al., 2004) . Prevalência de 45,0 % (82/182) dos cavalos situados em propriedades rurais em Goiás, com o sorovar *Icterohaemorrhagiae* identificado em 68,2% (56) dos animais (LINHARES et al., 2005).

Na Bahia observou-se 23,0% (24/106) de cavalos reagentes na mesma propriedade, sendo 42% para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* e 24 % para o sorovar Pyrogenes (GOMES et al., 2007). Em propriedades rurais do município de Monte Negro - Rondônia, 90,7% (146/161) dos cavalos foi reagentes pela SAM, com

frequência maior para os sorovares Bratislava (10,5%) e Icterohaemorrhagiae (8,7%) (AGUIAR et al., 2008).

Também há vários estudos sorológicos pelo mundo. Na Suíça, 58,5% (360/615) cavalos clinicamente saudáveis reagiram a *Leptospira* spp., sendo Pyrogenes (22,6%) e Canicola (22,1%) os sorovares mais frequentes (BLATTI et al., 2011). Estudo realizado em cavalos saudáveis e não saudáveis na Grécia demonstrou 27,0% (546/2017) reagentes com os sorovares Bratislava (16,6%) e Icterohaemorrhagiae (8,3 %) como mais prevalentes, não havendo diferença entre cavalos saudáveis e não saudáveis (BAVERUD et al., 2009). Em cavalos de corrida clinicamente saudáveis estudados na Coreia a prevalência foi de 25,0 % (307/1226), com maior frequência dos sorovares Sejroe (73,1%) e Bratislava (10,8%) (JUNG et al., 2010). Na Mongólia observou-se 17,1% (31/181) dos cavalos reagentes, principalmente para os sorovares Bratislava (64,5%) e Hardjo (29,0%) (ODONTSETSEG et al., 2005). No Irã, estudo realizado em cavalos situados em clubes de corrida demonstrou prevalência de 41,0% (39/95), sendo os sorovares mais encontrados Pomona (47,1%) e Grippothyphosa (41,0%) (HASSANPOUR et al., 2009). Em Cuba, um estudo realizado em cavalos utilizados no transporte de passageiros, a prevalência de 20% (76/390) cavalos reagentes foi encontrada. Os sorovares mais prevalentes foram Icterohaemorrhagiae (5%) e Canicola (4%) (CUENCA et al., 2007).

Quadro 01: Prevalência de *Leptospira* spp em cavalos de acordo com o estado brasileiro.

Estado	Número de Amostras	Prevalência	Sorovar mais prevalente	Referência
Rio Grande do Sul	125	73,6%	Pomona	LASTA et al., 2009
Rio Grande do Sul	39	100%	Icterohaemorrhagiae	MACIEL et al., 2008
Rio Grande do Sul	1169	74,5%	Bratislava	PIRES NETO et al., 2005
Paraná	115	33,0%	Icterohaemorrhagiae	MARINHO et al., 2010
Paraná	320	66,8%	Icterohaemorrhagiae	HASHIMOTO et al., 2007
São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás	1402	54%	Icterohaemorrhagiae	LANGONI, 2004
Goiás	182	45,0%	Icterohaemorrhagiae	LINHARES et al., 2005
Minas Gerais	6475	5,9%	Hardjo	CHIARELI et al., 2008
Rio de Janeiro	84	58,3%	Copenhageni	HAMOND et al., 2011
Rio de Janeiro	199	53,8%	Icterohaemorrhagiae	BRAGA et al., 2011
Rio de Janeiro	363	66,1%	Bratislava	PINNA et al., 2010
Rio de Janeiro	148	55,4%	Bratislava	PINNA et al., 2008
Bahia	106	23,0%	Icterohaemorrhagiae	GOMES et al., 2007
Rondônia	161	90,7%	Bratislava	AGUIAR et al., 2008

2.6 Sinais Clínicos

Em pessoas a leptospirose é uma doença bifásica: apresenta uma fase aguda ou leptospiremia que ocorre 7 a 9 dias após exposição ao agente causador, dura aproximadamente 3 dias e o sinal clínico presente é a pirexia. A segunda fase ou fase imunológica caracteriza-se pelo término da leptospiremia e aparecimento de anticorpos na circulação, o que ocorre 14 a 21 dias após infecção (LEVETT, 2001). A infecção é comum em mamíferos selvagens e domésticos sendo que cavalos reagem a muitos sorogrupos presentes no ambiente, mas a infecção é inaparente na maioria dos casos (ACHA e SZYFRES, 2001).

A infecção por *Leptospira* sp. em equinos, embora normalmente assintomática, tem sido associada à uveíte recorrente equina, abortos e outros sinais sistêmicos (PESCADOR et al., 2004; PIRES NETO et al., 2005). De acordo com Radostitis et al (2002), a uveíte em equinos é uma complicação tardia de leptospirose sistêmica com início dos sinais (fotofobia, lacrimejamento, conjuntivite, ceratite, hipópio e iridociclite) meses a anos após a infecção. A uveíte recidivante equina, também denominada oftalmia periódica, caracteriza-se por padrão clínico específico de inflamação intraocular em que episódios recidivantes de uveíte aguda são separados por períodos sem sinais clínicos. Nos estágios iniciais ocorre uveíte anterior e os repetidos episódios lesam outras estruturas como córnea, cristalino, corpo vítreo, retina e nervo óptico. Hartskeerl (2004) isolou leptospirosas patogênicas em 32% das 618 amostras de câmara vítrea e humor aquoso de cavalos com suspeita de uveíte recorrente. Os episódios agudos caracterizam-se por blefaroespasma e excessivo lacrimejamento; edema corneano generalizado dá aspecto azul esbranquiçado ao olho. A uveíte recidivante crônica é caracterizada por sinéquias posteriores disseminadas, despigmentação ou hiperpigmentação e atrofia da íris. Pode ocorrer glaucoma secundário (RADOSTITIS et al.; 2002).

Os sinais clínicos são variáveis, iniciando com inapetência, letargia e febre no início da fase de leptospiremia. Em éguas gestantes, é comum o relato de grande índice de reabsorção embrionária precoce, abortamentos no terço final da gestação ou

nascimento de potros prematuros e fracos (THOMASSIAN, 2005). A *Leptospira* sp. está entre as causas bacterianas mais comuns de abortamento em éguas (LU e MORRESEY, 2006). As éguas podem apresentar sinais sistêmicos discretos, como febre, anorexia, depressão e icterícia durante 3 ou 4 dias e o abortamento ocorre 1 a 3 semanas após a doença clínica. Comumente o abortamento ocorre entre o 7 e 11 mês de gestação e o feto apresenta icterícia e autólise (RADOSTITIS et al.; 2002).

Há relato de três casos clínicos em cavalos de uma mesma propriedade com disfunção renal por *Leptospira interrogans*. O sinal clínico inicial foi hipertermia refratária a antibiótico terapia. A titulação dos animais manteve-se alta mesmo após 90 dias do primeiro teste e início tratamento (FRELLSTEDT et al., 2009). Em estudo com infecção experimental, os cavalos apresentaram febre e anemia cinco dias após a inoculação (YAN et al., 2010). Em estudo relacionando a soro prevalência de leptospirose com a HPIE, encontrou-se que animais sororreagentes tinham 4,26 vezes mais chance de apresentar hemorragia pulmonar que os não reagentes (HAMOND et al., 2011).

2.7 Diagnóstico

O teste de soro aglutinação microscópica (SAM) é o teste mais indicado para diagnóstico da leptospirose (WHO, 2003). Ele é usado para detecção de anticorpos contra os diferentes sorovares de leptospira. Coloca-se o soro teste, em diluições seriadas, com vários sorovares de leptospira vivas e observa-se a aglutinação. Dilui-se as amostras inicialmente a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.900 µL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7.2. Em microplacas distribui-se 50 µL do soro diluído e adiciona-se 50 µL dos sorovares, duplicando a diluição inicial (100) (FAINE, 1999). A maior diluição em que 50 % das leptospiras estão aglutinadas é a titulação da amostra (ZIMMERMAN e CRISMAN, 2008). Considera-se reagente titulação igual ou superior a 100 (RADOSTITIS et al, 2002). Outro teste sorológico empregado é o ELISA-IgM, que detecta anticorpos da classe IgM e é menos sensível que o SAM (MORIKAWA, 2010).

Embora as técnicas de cultura possam ser usadas para detectar leptospiros na urina, esses procedimentos são lentos e trabalhosos, além das amostras poderem estar contaminadas com outros microrganismos (VELOSO et al., 2000). Leptospiros podem ser visualizadas em microscopia de campo escuro em amostras frescas de urina, mas essa técnica é pouco sensível (QUINN et al., 2005).

Levett et al (2005) realizaram a detecção de leptospiros patogênicos em amostra de sangue e urina por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) de tempo real, utilizando a codificação do gene de membrana externa LipL32, que expressa a lipoproteína durante infecções em mamíferos (HAAKE, 2000). Leptospiros já foram detectadas na urina de bovinos por PCR com especificidade de 100% para leptospiros patogênicos (BOMFIM et al, 2008). O diagnóstico pode ser realizado pela SAM, mas a confirmação de leptospiremia e leptospiúria às vezes não pode ser realizado pelo cultivo. No entanto, a PCR tem se demonstrado uma ferramenta rápida e definitiva no diagnóstico que deveria ser mais utilizada para diagnosticar casos suspeitos de leptospirose (PINNA et al., 2011).

2.8 Tratamento

O tratamento da leptospirose equina é realizado com antibióticos, destacando-se estreptomicina, penicilina e tetraciclina (PAVORD e PAVORD, 2007; THOMASSIAN, 2005).

Nos casos de uveíte recorrente, inicia-se a terapia sintomática combinando antiinflamatórios esteróides e não esteróides e midriáticos. O antiinflamatório não esteróide de escolha é a flunixinina meglumina. Corticosteróides tópicos podem ser aplicados 3 a 4 vezes por dia. Preparações antibióticas tópicas como neomicina – polimixina B ou gentamicina auxiliam a prevenir infecção por bactérias oportunistas e a antibioticoterapia parenteral auxilia na redução dos títulos para *Leptospira* spp.

Nenhuma terapia é indicada em olhos não doloridos com lesões de uveíte crônica em estágio final (RADOSTITIS et al.; 2002).

Éguas que sofreram abortamento por *Leptospira* spp. devem ser isoladas e ter as baias desinfetadas. O tratamento consiste em utilizar antibióticos sistêmicos como estreptomicina (10 mg/Kg duas vezes ao dia); penicilina benzatina (15000 UI/ Kg duas vezes ao dia) ou oxitetraciclina (10mg/Kg) por uma semana (RADOSTITIS et al.; 2002).

2.9 Profilaxia

Um plantel de 148 equinos avaliado na região serrana do Rio de Janeiro, com presença de lago natural e histórico de inundações frequentes, apresentava alto índice de abortamentos, outros problemas reprodutivos como morte embrionária e neonatal, além de uveíte; os fetos abortados apresentavam icterícia e hepatomegalia, sinais compatíveis com leptospirose. Dos animais testados, 82 (55,4%) foram reagentes, sendo o sorovar Bratislava o mais frequente. Medidas de controle incluindo a vacinação dos animais do plantel, controle de animais que ingressavam no haras e drenagem ou isolamento de áreas alagadiças foram realizados, com consequente redução dos problemas reprodutivos e soro prevalência (PINNA, VARGES e LILENBAUM, 2008). Evitar a presença de roedores nos depósitos de ração e grãos pode ajudar a evitar a doença (THOMASSIAN, 2005).

Há uma vacina inativada disponível no mercado, que foi elaborada para equinos e contém 12 sorovares: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Bratislava, Copenhageni Pomona, Grippothyphosa, Tarassovi, Hardjo prajitno, Andamana, Ballum , Wolffii e Pyrogenes. A recomendação do fabricante é aplicar dose e reforço após 30 dias para adultos nunca vacinados e potros com mais de 04 meses; e reforço semestral (LEPTO, 2012).

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Ed. PAHO, v.3, p. 157-168, Washington, 2001.

ADLER B, MOCTEZUMA A DE LA PEÑA. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; OKUDA, L. H.; STÉFANO, E.; NASSAR, A. F. C.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n.4, p. 269-276, 2008.

BARWICK RS, MOHAMMED HO, MCDONOUGH PL, WHITE ME. Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p.1097-1103, 1997.

BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E. O.; FRANZEN, P.; EGENVALL, A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 2009. Disponível em: www.actavetscand.com/content/51/1/15

BLATTI, S.; OVERESCH, G.; GERBER, V.; FREY, J.; HUSSE, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**. v.153,n.10,p.449-56, 2011.

BRAGA,J.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; ABREU, R. N.; LILENBAUM, W. Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n.2, p.147-150, 2011.

BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA- STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. **The Veterinary Journal**, v. 178, p. 251-256, 2008.

CARTER, G. R.; WISE, D. J. Borrelia, Treponema ,Brachyspia and Leptospira. In: **Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology**, 6 ed. Iowa State Press, p. 219-225, 2004.

CHIARELLI, D.; MOREIRA, E.C.; GUTIÉRREZ, H. O. D.; RODRIGUES, R.O.; MARCELINO, A. P.; MENESES, J. N. C.; ALMEIDA, V.M.A. Frequência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em equídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60,n.6,p.1576-1579,2008.

CUENCA, J. C. C.; RODRIGUEZ, O. C.; PRADO, E. A. S.; PÉREZ, R. C.; PÉREZ, Y. G. Prevalencia de leptospirosis em equinos de tracción em La ciudad de Santa Clara, Cuba. **Revista eletrônica de Veterinária**. v. 8, n. 6, 2007.

DESVARIS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **Epidemiology and Infection**.v. 139, p.167-188,2011.

FAINE, S., ADLER, B., BOEIN, C., PEROLAT, P., 1999. **Leptospira and Leptospirosis**. 2.ed., MedSci, Melbourne, Austrália.

FRELLSTEDT, L.; SLOVIS, N. M. Acute renal disease from *Leptospira interrogans* in three yearlings from the same farm. **Equine Veterinary Education**, p.478-484, 2009

GRECO, D. B. Ética, saúde e pobreza: as doenças emergentes do século XXI. Disponível em: www.cfm.org.br/revista/bio2v7/etica.htm

GOMES, A. H. B., OLIVEIRA, F. C. S., CAVALCANTI, L. A., CONCEIÇÃO, I. R., SANTOS, G. R., RAMALHO, E. J., VIEGAS, S. A. R. A. Ocorrência de aglutininas antileptospira em soro de equinos no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.8, n.3, p. 144-151, jul/set. 2007.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 is a Lipoprotein Expressed During Mamalian Infection. **Infection and Immunity**, v.68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAMOND C, MARTINS G, REIS J, KRAUS E, PINNA A, LILENBAUM W. Pulmonary hemorrhage in horses seropositive to leptospirosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.31, n.5, p. 413- 415, 2011.

HARTSKEERL, R. A.; GORIS, M. G. A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n.3, p. 110-115, 2004.

HASHIMOTO, V. Y.; GONÇALVES, D. D.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; ALVES, L. A.; REICHMANN, P.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49,n. 5, p. 327-330, 2007.

HASSANPOUR, A.; MONFARED, N.; ABDOLLAHPOUR, G. R.; SATARI,S. Seroprevalence of leptospiral infection in horse in Tabriz – Iran. **Journal of Bacteriology Research**, v. 1,n.8,p.97-100, 2009.

JUNG, B. Y.; LEE, K. W.; HA, T. Y. Seroprevalence of *Leptospira* spp. In Clinically Healthy Racing Horses in Korea. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science** , v.72,n. 2, p. 197-201, 2010.

LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; DE LIMA V. Y. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **The Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 207-218 , 2004

LASTA, C. S.; MERINI, L. P.; OLIVEIRA, S. T.; GALIMBERTI,V.; PEDRALLI, V.; CORMELATO, A.T.; PIRES NETO, J.A.S.;BECK, C. A. C.; GONZALEZ, F. H.D.; LEMOS, L. A. Anti-leptospirosis agglutinin researching in the serum of rig pulling equine in Porto Alegre/RS-Brasil. **Proceedings of the 11 th International Congress of the World Equine Veterinary Association**,2009. Disponível em: www.ivis.org

LEPTO equus. Disponível em: www.vencofarma.com.br. Acesso em: fevereiro de 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis.**Clinical Microbiology Review** , v. 14, n.2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWEY, R. L.; TURNER, D. E.; STEIGERWALT, A. G.; MYER, L. W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.45-49, 2005.

LINHARES, G. F. C.; GIRIO, R. J. S.; LINHARES, D. C. L. MONDEIROS, L. C.; OLIVEIRA, A. P. Á. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas prevalências em Cavalos da Microrregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 255-259, 2005.

LU, K. G.; MORRESEY, P. R. Reproductive Tract Infections in Horses. **The Veterinary Clinics of North America Equine**, v.22, p. 519-552,2006.

MACIEL, R.M.; LOPES, S.T.A.; MARTINS, D.B.; FRANCISCATO, C.; MERINI, L.P.3; COSTA, M.M.2; BADKE, M.R.T.; GONÇALVES. A.P. VEIGA, A.P.M.; MÜHLEN, R.V. Incidência de aglutininas anti-leptospira em soro de eqüinos utilizados na tração de carroças no município de Santa Maria -RS. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 35. Resumo, Gramado-RS. 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1040-2.pdf>

MARINHO, A. P., FINGER, M. A, DECONTO, I., DORNBUSH, P. T., ULLMANN, L. S., LANGONI, H., Barros Filho, I. R. de, BARROS, C. C., PAMPUSCH, R., BONACIN, J., MORIKAWA, V. M., BIONDO, A. W. Leptospirose em cavalos carroceiros de Curitiba-PR e Região Metropolitana. In: ABRAVEQ Nordeste, 2010, Porto de Galinhas. **Medicina Veterinária nos Trópicos**. , 2010.

MOREY, R.E.; GALLOWAY, R.L.; BRAGG, S.L.; STEIGERWALT, A.G.; MAYER, L.W.; LEVETT, P.N. Species-specif identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.3510-3516, 2006

MORIKAWA, V. M. Leptospirose. In: **Manual de Zoonoses**. v. 1, 2 ed, p. 91-99, 2010. Disponível em: www.zoonoses.org.br . Acesso em: janeiro,2012.

ODONTSETSEG,N.; BOLDBAATAR, D.; MWLLENE, A. S.; KIDA, H. Serological prevalence of Leptospira interrogans serovar Bratislava in horses in Mongolia. **Veterinary Record**, v. 157, p. 518-9,2005.

PAVORD, T.; PAVORD, M. **The Complete Equine Veterinary Manual**. 255p, 2007.

PEROLAT, P.; CHAPPEL, R. J.; ADLER, B.; BARANTON, G.; BULACH, D. M.; BILLINGUHRST, M. L.; LETOCART, M.; MERIEN, F.; SERRANO, M. S. *Leptospira fainei* sp. Nov., isolated from pigs in Australia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 851-858, 1998.

PESCADOR CA, CORBELLINI LG, LORETTI AP, WUNDER E, FRANTZ FJ, DRIEMEIER D. *Leptospira* sp. as a cause of equine abortion. **Ciência Rural**, v.34, n.1, 271-4, 2004.

PINNA, M.H.; VARGES, R.; LILENBAUM, W. Aplicação de um programa integrado de controle da leptospirose em equinos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.15, n.2, p.63-66, 2008.

PINNA, A.; VARGES, R.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Soro reatividade para leptospirose em éguas envolvidas em programas de transferências de embriões. In: In: XI Conferência Anual Abraveq - São Paulo-SP, 2010. **Abraveq ANAIS Suplemento I Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, v.29. p. 322-323. 2010.

PINNA, A. E.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. Molecular diagnosis of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.413, 2011.

PIRES NETO, J. A. S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M.A.M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**, v. 2, p.165-176, 2005.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária – **Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9 ed., ed. Guanabara Koogan, 2002.

QUINN, P. J. MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Espiquetas. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed. Artmed, p.179-189, 2005

THOMASSIAN, A. Enfermidades Infecciosas In: **Enfermidades dos Cavalos**. Ed. Livrarias Varela, 4 ed., 2005.

VELOSO, I. F., LOPES, M. T. P., SALAS, C. E., MOREIRA, E. C. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.339-343, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Disponível em: www.who.int

YAN W, FAISAL SM, DIVERS T, McDONOUGH SP, AKEY B, CHANG YF. Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kinnewicki Infection of Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n.4, p. 912-7, 2010.

ZIMMERMAN, K. L.; CRISMAN, M. V. D. Diagnostic Equine Serology. **Veterinary Clinics of Equine Practice**, v.24, p. 311-334, 2008

3. LEPTOSPIRA SPP. EM CAVALOS CARROCEIROS DO MUNICÍPIO DE PINHAIS-PR

Leptospira spp. in cart horses from Pinhais – PR

3.1 Resumo:

No ano de 2011 foram notificados 07 de casos de leptospirose humana no município de Pinhais, sendo que 03 deles evoluíram a óbito (SINAN, 2012). Cavalos carroceiros circulam por centros urbanos, podendo carrear zoonoses. Foram utilizados 138 cavalos carroceiros em 153 amostragens realizadas em 04 eventos de extensão no município de Pinhais - PR. Realizou - se exames laboratoriais (Ht, PPT e fibrinogênio) e sorologia para leptospirose (SAM) em todas as amostras. Realizou-se qPCR em 29 amostras de sangue total e 19 amostras de urina. Prevalência de 15,03% (23/153) foi observada, sendo os sorovares Pomona (47,83%) e Canicola (13,04%) os mais prevalentes. Não houve diferença entre gênero ($p = 0,15$) e idade (0,08) de animais reagentes e não reagentes, bem como os exames laboratoriais: VG ($p = 0,19$) e PPT ($p = 0,20$). Cavalos não reagentes apresentaram valores de fibrinogênio maiores do que cavalos reagentes ($p = 0,03$). Nenhuma amostra de sangue ou urina foi positiva na qPCR. Conclui-se que idade e sexo não influenciam na sorologia para leptospirose bem como VG, PPT e fibrinogênio não são afetados em cavalos reagentes. A prevalência para leptospirose em cavalos do município de Pinhais é de 15,03% e o sorovar mais encontrado é Pomona.

Palavras – chave: Leptospira spp.; cavalo carroceiro; SAM; qPCR.

3.2 Abstract:

There were 07 notified cases and 03 deaths of human leptospirosis in Pinhais city in 2011 (SINAN, 2012). Cart horses cross urban centers, maybe carrying zoonosis. 138 cart horses and 153 samples were obtained in 04 events in Pinhais city. Laboratorial tests (PCV, TPP and fibrinogen) and serology (MAT) were performed in all samples. qPCR was performed in 29 whole blood and 19 urine samples. A prevalence

of 15.03 % (23/153) was observed and serovars Pomona (47.83%) and Canicola (13.04%) were the most prevalent. There were no difference between gender ($p = 0.15$) and age ($p = 0.08$) in reagent and no reagent horses, as with laboratory tests PCV ($p = 0.19$) e TPP ($p = 0.20$). No reagent horses showed higher fibrinogen than reagent horses ($p = 0.03$). No sample of blood or urine was positive in qPCR. It is concluded that age and gender did not influence serology to leptospirosis as PCV, TPP and fibrinogen are not affected in reagent horses. Leptospirosis prevalence in cart horses from Pinhais city is 15.03% and the most prevalent serovar is Pomona.

Key – words: *Leptospira* spp.; cart horse; MAT; qPCR.

3.3 Introdução

Atualmente os cavalos são uma fauna urbana emergente e são utilizados como animais de tração de carroças de coletores de materiais recicláveis que circulam por centros urbanos. A possibilidade de que zoonoses possam ser carregadas por toda área de circulação destes animais por Curitiba e região metropolitana gera uma demanda de monitoramento dos mesmos. Os locais onde se encontram os animais e seu estado imunológico possivelmente favoreçam a ocorrência de diversas enfermidades. Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias e de infra-estrutura são precárias, junto a lixões, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados, proximidade com outras espécies animais, constituem - se particularmente em população de risco para leptospirose (BARWICK et al., 1997).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, considerada doença reemergente no século XXI (GRECO, 2001). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica e constitui um sério risco à saúde pública (FIGUEIREDO et al., 2001). No ano de 2011 foram notificados 07 de casos de leptospirose humana no município de Pinhais, sendo que 03 deles evoluíram a óbito (SINAN, 2012).

A infecção é comum em mamíferos selvagens e domésticos e os cavalos reagem a muitos sorogrupos prevalentes no ambiente, mas a infecção é inaparente na maioria dos casos (ACHA e SZYFRES, 2001). Desta maneira, é possível que os cavalos sejam infectados por *Leptospira* sp. e apresentem uma fase de leptospirúria sem apresentar qualquer sinal clínico. Hashimoto et al (2007) ressaltaram que a possibilidade de cavalos soro reagentes assintomáticos eliminarem leptospiros através da urina aliados a proximidade desses animais com os seres humanos denota a necessidade de mais estudos para determinar o papel do cavalo na transmissão de leptospirose. De acordo com Dias et al (2007), a identificação de fatores que interferem na dinâmica da circulação de *Leptospira* na população como fatores ambientais de transmissão, podem contribuir para melhorar o conhecimento em leptospirose urbana e delinear políticas de intervenção e controle para esse problema emergente em saúde pública.

A transmissão de *Leptospira* sp. entre seres humanos praticamente não ocorre, sempre havendo a necessidade de um animal para transmissão (WHO, 2003). Quase todos os mamíferos têm sido demonstrados como carreadores de *Leptospira* sp. (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Esse fato reforça a importância de maiores estudos da leptospirose em animais e de que maneira eles atuam como carreadores da bactéria.

O método diagnóstico mais indicado para leptospirose é teste de soro aglutinação microscópica (SAM) (WHO, 2003), que detecta anticorpos contra os diversos sorovares de *Leptospira* sp. (ZIMMERMAN e CRISMAN, 2008). No entanto, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tem se demonstrado uma ferramenta rápida e definitiva no diagnóstico que deveria ser mais utilizada para diagnosticar casos suspeitos de leptospirose (PINNA et al., 2011). O objetivo do presente estudo é obter a prevalência de leptospirose no município de Pinhais – PR e a ocorrência leptospirúria e leptospiremia em cavalos carroceiros.

3.4 Material e Métodos

Foram utilizados 138 cavalos carroceiros (73 machos e 65 fêmeas) atendidos durante 04 eventos de extensão universitária intitulados “Dia do Carroceiro”, totalizando 153 amostras. Onze (11) animais participaram de mais de uma coleta (Tabela 01). A primeira coleta foi realizada em março; a segunda coleta em junho; a terceira em setembro e a quarta em novembro de 2011. Realizou-se coleta de sangue por venopunção jugular utilizando-se agulha 40 x12 mm e tubos com e sem anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético) em todos os animais. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação a 1207 g por 10 minutos, utilizando – se centrífuga Parsec[®] modelo CT 0603. Soro aglutinação microscópica (SAM) foi realizada em todas as amostras de soro que foram diluídas inicialmente a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.900 µL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF), pH 7,2. Em microplacas distribuiu-se 50 µL do soro diluído e adicionou-se 50 µL dos sorovares, duplicando a diluição inicial. O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de controle negativo (FAINE et al., 1999). As amostras foram testadas contra 15 sorovares: Bratislava, Castellonis, Canicola, Djasiman, Gryppotifosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Hardjo prajitno, Hardjo miniswajizak, Hardjo C. T. G., Hardjo bovis, Wolffii e Tarassovi. Títulos maiores ou iguais a 100 foram consideradas reagentes (RADOSTITIS et al.;2002).

Amostras de sangue total foram utilizadas para obtenção dos seguintes dados laboratoriais: volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio. O volume globular foi obtido utilizando microtubos capilares, microcentrífuga e cartão para leitura de hematócrito; os valores de PPT foram obtidos usando refratômetro portátil para determinação de proteína em soro e densidade em urina; e fibrinogênio utilizando refratômetro e banho maria Delta modelo 11C105D, a 56° C por 3 minutos. Em 19 animais da coleta realizada em setembro realizou-se coleta de urina. Para obtenção de amostras de urina os animais foram sedados com acepromazina intravenosa na dose de 0,05 mg / Kg . Para o procedimento de coleta, utilizou-se sonda nasogástrica humana de cloreto de polivinila marca Medsonda[®], seringa e cloridrato de lidocaína gel 2 % para lubrificação. Para machos utilizou-se sonda longa (110centímetros) número 16 e para fêmeas sonda curta (40 centímetros) número 16. A reação da polimerase em

cadeia em tempo real (qPCR) foi realizada em 29 amostras de sangue total e 19 amostras urina na tentativa de se detectar o ácido nucléico das leptospiros.

Utilizou-se teste estatístico de Fischer para comparação dos dados, com exceção dos dados referentes a idade dos animais que foi realizada através de Test T Student.

3.5 Resultados e Discussão

Das 153 amostras testadas, 15,03% (23) reagiram a *Leptospira* spp. na SAM com titulações entre 100 e 3200. A distribuição de acordo com o sorovar está demonstrada no gráfico 1. Os sorovares mais prevalentes foram Pomona (47,83%) e Canicola (13,04%). A média de idade dos animais soro reagentes foi de $6,5 \pm 4,3$ anos e dos cavalos não reagentes $8,1 \pm 4,6$ anos. Não houve diferença na idade de cavalos reagentes e não reagentes ($p = 0,08$). Entre os reagentes, 47,83% (11) eram machos e 52,17% (12) fêmeas. Entre as amostras não reagentes, 53,85% (70) pertenciam a machos e 46,15% (60) a fêmeas. Não houve diferença entre machos e fêmeas ($p = 0,15$). Onze animais participaram de mais de uma amostragem e a variação nos resultados da SAM pode ser observada na tabela 01.

Gráfico 01 - Sorologia para *Leptospira* spp. de acordo com sorovar em cavalos carroceiros no município de Pinhais – PR, 2012.

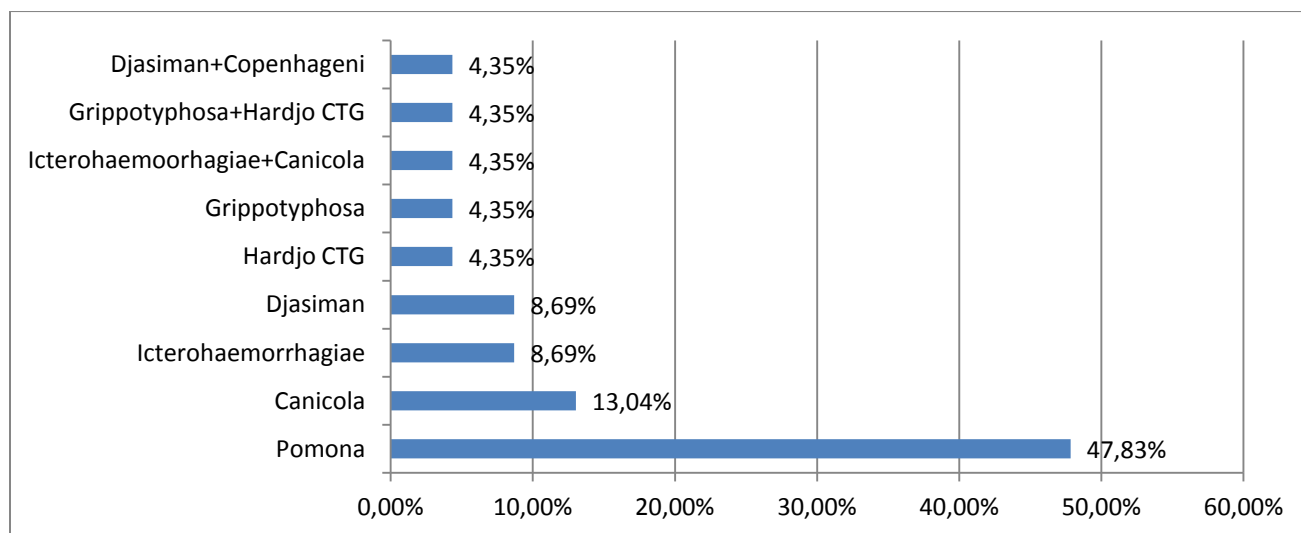


Tabela 01 – Sorologia para *Leptospira* spp. de cavalos carroceiros que participaram de mais de uma amostragem no município de Pinhais – PR, 2012.

<i>Animal</i>	Coleta 01		Coleta 02		Coleta 03		Coleta 04	
	<i>SAM</i>	<i>Sorovar</i>	<i>SAM</i>	<i>Sorovar</i>	<i>SAM</i>	<i>Sorovar</i>	<i>SAM</i>	<i>Sorovar</i>
1	x	x	200; 100	Djasiman; Copenhageni	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	200	Pomona	x	x	x	x
3	x	x	x	x	100	Pomona	NR	NR
4	NR	NR	NR	NR	x	x	x	x
5	NR	NR	x	x	x	x	NR	NR
6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
7	NR	NR	NR	NR	x	x	x	x
8	x	x	NR	NR	x	x	NR	NR
9	x	x	NR	NR	x	x	NR	NR
10	x	x	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11	x	x	x	x	NR	NR	NR	NR

NR: não reagente X: não participou

As médias dos dados laboratoriais dos animais reagentes e não reagentes foram, respectivamente: PPT $7,85 \pm 0,70$ e $7,71 \pm 0,62$ g/dL; fibrinogênio $213,04 \pm 132,87$ e $356,15 \pm 251,45$ mg/dL; VG $36 \pm 0,08$ % e $37 \pm 0,08$ %. Não houve diferença entre os valores de VG ($p = 0,19$) e PPT ($p = 0,2$) dos animais reagentes e não reagentes. Animais não reagentes apresentaram fibrinogênio mais alto do que animais reagentes ($p = 0,03$). Nenhuma das 29 amostras de sangue total, dentre as quais 06 soro reagentes, foi positiva na qPCR. Nenhuma das 19 amostras de urina, dentre as quais 03 soro reagentes, foi positiva na qPCR.

A prevalência encontrada no presente estudo é menor do que a encontrada por outros pesquisadores em estudos com cavalos carroceiros, como: 100% (39/39) em Santa Maria - RS (MACIEL et al., 2008); 73,6% (92/125) em Porto Alegre – RS (LASTA et al., 2009); 66,8% (214/320) em Londrina – PR (HASHIMOTO et al., 2007) e 33,0% (38/115) na região metropolitana de Curitiba – PR (MARINHO et al., 2010). E também em estudos com cavalos com outras finalidades em outros países, como: 58,5% (360/615) na Suíça (BLATTI et al., 2011); 41,0% (39/95), no Irã (HASSANPOUR et al., 2009); 27,0% (546/2017) na Grécia (BAVERUD et al., 2009) e 25,0 % (307/1226) na Coreia (JUNG et al., 2010). Em Minas Gerais encontrou-se prevalência menor do que no presente estudo: 5,9 % (381/6475) em cavalos situados em propriedades rurais (CHIARELI et al., 2008). Esperava-se uma prevalência maior no presente estudo, pois apesar do acompanhamento dos cavalos pelo projeto Carroceiro pelo segundo ano consecutivo, no município de Pinhais, são poucos os proprietários que trazem seus cavalos a todos os eventos. Cavalos carroceiros geralmente não têm acesso a cuidados veterinários, possuem alimentação inadequada e condições sanitárias precárias. Cavalos de trabalho têm mais chance de se infectar por *Leptospira* spp. do que cavalos de esporte (LANGONI et al., 2004). Provavelmente as orientações e acompanhamento do projeto junto aos proprietários e animais tenha colaborado para melhorar as condições dos cavalos carroceiros. Ou possivelmente os cavalos do presente estudo não tenham sido expostos a *Leptospira* spp. no ambiente.

A maior parte dos estudos no Brasil demonstrou os sorovares *Icterohaemorrhagiae* (BRAGA et al., 2011; MARINHO et al., 2010; MACIEL et

al.,2008;GOMES et al., 2007; HASHIMOTO et al.,2007; LINHARES et al.,2005) e Bratislava (AGUIAR et al., 2008; PINNA, VARGES e LILENBAUM, 2008; PINNA et al.,2010; PIRES NETO et al.,2005) como sorovares mais prevalentes. Neste estudo os sorovar mais prevalente foi o Pomona, assim como no Rio Grande do Sul (LASTA et al., 2009). Sexo e idade não estão correlacionados a sorologia para leptospirose em cavalos (JUNG et al., 2010) , como demonstrado neste estudo. Analisando os dados contidos na tabela 01, observamos que os cavalos 1,2 e 3 foram reagentes em apenas uma das coletas e que o restante dos cavalos foi não reagente em todas as coletas que participaram. Provavelmente esses cavalos têm pouco ou nenhum contato com *Leptospira* spp. na área em que circulam.

Em estudo com infecção experimental em cavalos, demonstrou-se que os animais não apresentavam alterações no fibrinogênio, mas alguns cavalos tiveram anemia (YAN et al.,2010). No presente estudo, animais não soro reagentes apresentaram valores maiores de fibrinogênio provavelmente devido a outros processos patológicos não aparentes. Valores de VG e PPT não foram afetados pela infecção por *Leptospira* spp. neste estudo. Esses parâmetros foram utilizados pela praticidade e velocidade da realização do teste laboratorial.

Nenhuma das amostras de sangue ou urina foi positiva na qPCR. Provavelmente isso ocorreu pelo fato de que boa parte dos cavalos (23 amostras de sangue e 16 amostras de urina) nem mesmo foi reagente na SAM. Entre os cavalos reagentes (6 das amostras de sangue e 03 das amostras de urina) observou-se titulações entre 100 e 3200, sendo: dois animais com titulação 100 e um animal com titulação 3200 para o sorovar Pomona; dois animais com titulação 100 e dois com titulação 200 para o sorovar Canicola; um com titulação 100 para o sorovar Icterohaemorrhagiae e um com titulação 100 para o sorovar Hardjo CTG. Possivelmente esses animais não estavam na fase aguda da infecção por isso não apresentaram leptospirúria ou leptospiremia. Um dos animais (número 3 da Tabela 2) apresentou-se não reagente num intervalo de 03 meses. Um estudo com infecção experimental, demonstrou que cavalos apresentam leptospirúria (diagnosticada por microscopia de

campo escuro e cultura) 4 semanas após a infecção; e leptospiremia (diagnosticada por hemocultura) entre 3 e 6 dias após infecção (YAN et al.;2010).

3.6 Conclusão

Conclui-se que idade e sexo não influenciam na sorologia para leptospirose bem como VG, PPT e fibrinogênio não são afetados em cavalos reagentes. A prevalência para leptospirose em cavalos do município de Pinhais é de 15,03% e o sorovar mais encontrado é Pomona.

Referências

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Ed. PAHO, v.3, p. 157-168, Washington, 2001.

ADLER B, MOCTEZUMA A DE LA PEÑA. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296. 2010.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; OKUDA, L. H.; STÉFANO, E.; NASSAR, A. F. C.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V. 45, n.4, p. 269-276, 2008.

BARWICK RS, MOHAMMED HO, MCDONOUGH PL, WHITE ME. Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p.1097-1103 1997.

BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E. O.; FRANZEN, P.; EGENVALL, A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 2009. Disponível em: www.actavetscand.com/content/51/1/15

BLATTI, S.; OVERESCH, G.; GERBER, V.; FREY, J.; HUSSE, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**. V.153,n.10,p.449-56, 2011.

BRAGA, J.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; ABREU, R. N.; LILENBAUM, W. Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.2, p.147-150, 2011.

CHIARELLI, D.; MOREIRA, E.C.; GUTIÉRREZ, H. O. D.; RODRIGUES, R.O.; MARCELINO, A. P.; MENESES, J. N. C.; ALMEIDA, V.M.A. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em equídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.6, p.1576-1579, 2008.

DIAS, J.P.; TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M.C.N.; MENDES, C.M.C.; GUIMARÃES, P.; REIS, M. G.; KO, A.; BARRETO, M.L. Fatores associados á infecção por *Leptospira sp* em um grande centro urbano do Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 40, n.5, p. 499-504, 2007.

FAINE, S., ADLER, B., BOEIN, C., PEROLAT, P., 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2.ed., MedSci, Melbourne, Austrália.

FIGUEIREDO, C. M. C.M., MOURÃO, A.C., OLIVEIRA, M.A.A., ALVES, W.R., OOTEMAN, M.C., CHAMONE, C.B., KOURY, M.C. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.:331-338, 2001

GRECO, D. B. Ética, saúde e pobreza: as doenças emergentes do século XXI. Disponível em: www.cfm.org.br/revista/bio2v7/etica.htm

GOMES, A. H. B., OLIVEIRA, F. C. S., CAVALCANTI, L. A., CONCEIÇÃO, I. R., SANTOS, G. R., RAMALHO, E. J., VIEGAS, S. A. R. A. Ocorrência de aglutininas antileptospira em soro de eqüinos no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p. 144-151, jul/set. 2007.

HASHIMOTO, V. Y.; GONÇALVES, D. D.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; ALVES, L. A.; REICHMANN, P.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49,n. 5, p. 327-330, 2007.

HASSANPOUR, A.; MONFARED, N.; ABDOLLAHPOUR, G. R.; SATARI, S. Seroprevalence of leptospiral infection in horse in Tabriz – Iran. **Journal of Bacteriology Research**, v.1, n.8, p.97-100, 2009.

JUNG, B. Y.; LEE, K. W.; HA, T. Y. Seroprevalence of *Leptospira* spp. In Clinically Healthy Racing Horses in Korea. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science** , v.72,n. 2, p. 197-201, 2010.

LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; DE LIMA V. Y. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **The Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 207-218 , 2004

LASTA, C. S.; MERINI, L. P.; OLIVEIRA, S. T.; GALIMBERTI, V.; PEDRALLI, V.; CORMELATO, A.T.; PIRES NETO, J.A.S.; BECK, C. A. C.; GONZALEZ, F. H.D.; LEMOS, L. A. Anti-leptospirosis agglutinin researching in the serum of rig pulling equine in Porto Alegre/RS-Brasil. Proceedings of the 11 th International Congress of the World Equine Veterinary Association, 2009. Disponível em: www.ivis.org

LINHARES, G. F. C.; GIRIO, R. J. S.; LINHARES, D. C. L. MONDEIROS, L. C.; OLIVEIRA, A. P. Á. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas prevalências em Cavalos da Microrregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira** v. 6, n. 4, p. 255-259, 2005.

MACIEL, R.M.; LOPES, S.T.A.; MARTINS, D.B.; FRANCISCATO, C.; MERINI, L.P.3; COSTA, M.M.2; BADKE, M.R.T.; GONÇALVES, A.P. VEIGA, A.P.M.; MÜHLEN, R.V. Incidência de aglutininas anti-leptospira em soro de eqüinos utilizados na tração de carroças no município de Santa Maria -RS. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35. Resumo, Gramado-RS. 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1040-2.pdf>

MARINHO, A. P., FINGER, M. A, DECONTO, I., DORNBUSH, P. T., ULLMANN, L. S., LANGONI, H., Barros Filho, I. R. de, BARROS, C. C., PAMPUSCH, R., BONACIN, J., MORIKAWA, V. M., BIONDO, A. W. Leptospirose em cavalos carroceiros de Curitiba-PR e Região Metropolitana. In: ABRAVEQ Nordeste, 2010, Porto de Galinhas. **Medicina Veterinária nos Trópicos**. , 2010.

PINNA MH, VARGES R, LILENBAUM W. Aplicação de um programa integrado de controle da leptospirose em equinos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, 2008, 15(2), 63-6.

PINNA, A.; VARGES, R.; HAMOND, C.; MARTINS,G.; LILENBAUM, W. Soro reatividade para leptospirose em éguas envolvidas em programas de transferências de embriões. In: In: XI Conferência Anual Abraveq - São Paulo-SP, 2010. **Abraveq ANAIS Suplemento I Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**. , 2010. v.29. p. 322-323.

PINNA, A. E.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. Molecular diagnosis of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. **Veterinary Microbiology**, v.153, p.413,2011.

PIRES NETO, J. A. S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M.A.M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**, v. 2, p.165-176, 2005.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária – **Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9 ed., ed. Guanabara Koogan, 2002.

Secretaria do Estado da Saúde do Paraná/ SESA-PR. Divisão de Zoonoses. **Banco de Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação / SINAN 2012**.

Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

YAN W, FAISAL SM, DIVERS T, McDONOUGH SP, AKEY B, CHANG YF. Experimental *Leptospira interrogans* Seroovar Kinnewicki Infection of Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n.4, p. 912-7, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Disponível em: www.who.int

ZIMMERMAN, K.L.; CRISMAN, M. V. D. Diagnostic Equine Serology. **Veterinary Clinics of Equine Practice**, v.24, p. 311-334, 2008.

4. INQUÉRITO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *LEPTOSPIRA* SPP. EM CAVALOS CARROCEIROS DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEPTOSPIROSE HUMANA EM CURITIBA, SUL DO BRASIL

Serological and molecular survey of Leptospira spp. in cart horses from an endemic area of human leptospirosis in Curitiba, Southern Brazil

4.1 RESUMO

Cavalos carroceiros é uma população emergente empregada para transportar materiais recicláveis em áreas metropolitanas do Brasil. Em área endêmica para leptospirose em pessoas foram colhidas amostras de 62 cavalos. Soro aglutinação microscópica (SAM) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foram realizadas. Observou-se soro positividade em 75,8% (47/62) com sorovar Icterohaemorrhagiae em 80,8% (38/47) dos cavalos. Amostras de sangue e urina foram qPCR negativas. Observou-se correlação positiva SAM e pluviosidade ($p = 0,02$) e alagamentos ($p = 0,03$). Embora cavalos possam estar constantemente expostos a *Leptospira* spp. ambiental, principalmente por chuvas e inundações, leptospiremia e leptospirúria não foram encontradas neste estudo.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., SAM, qPCR.

4.2 ABSTRACT

Cart horses are an emerging population employed to carry recyclable material in metropolitan areas of Brazil. During three visits, 62 horses were sampled in a human leptospirosis endemic area. Microscopic Agglutination Test (MAT) and real time Polymerase Chain Reaction (qPCR) were performed. Seropositivity in 47/62 (75.8%) with serovar Icterohaemorrhagiae in 38/47 (80.8%) horses was observed. Blood and

urine were qPCR negative. MAT positive correlation was observed with rainfall ($p=0.02$) and flooding ($p=0.03$). Although horses may be exposed to environmental *Leptospira* spp., mostly by rainfall and flooding, no leptospiremia or leptospiruria was found in the present study.

Keywords: *Leptospira* spp., MAT, qPCR

4.3 Introdução

Leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com roedores desempenhando importante papel como reservatório para o ciclo de *Leptospira* spp. e sua manutenção em áreas urbanas de países tropicais (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). A doença é altamente endêmica no Brasil com mais de 10.000 casos em pessoas notificados entre os anos de 2009 e 2011, com 9,3% de letalidade. O número de casos confirmados e mortes em pessoas têm aumentado no estado do Paraná nos últimos três anos, especialmente em Curitiba: em 2009, dos 201 casos confirmados no Paraná, 80 foram em Curitiba, com 12 óbitos; em 2010, dos 306 casos notificados no Paraná, 170 foram em Curitiba com 26 óbitos; em 2011, das 347 pessoas com leptospirose no Paraná, 214 estavam em Curitiba e 35 óbitos ocorreram (SINAN, 2012).

Pessoas, cães e cavalos dividem, em parte, o mesmo biótopo, desse modo o ser humano também está exposto a *Leptospira* spp. patogênicas que infectam esses animais (HOUWERS et al.; 2011). Aproximadamente 1.500 cavalos carroceiros dividem a mesma área urbana que mais de 1,5 milhões de pessoas em Curitiba-PR (IBGE, 2010). Cavalos carroceiros são parte de uma fauna urbana emergente utilizada para recolhimento de material reciclável em centros urbanos (LARA et al.; 2006).

Infecções por *Leptospira* spp. em cavalos, embora normalmente assintomáticas, tem sido associadas com uveíte recorrente, abortamentos e outros sinais sistêmicos (PIRES NETO et al.; 2005). A possibilidade de cavalos soro reagentes assintomáticos eliminar *Leptospira* spp. na urina combinados com a proximidade desses animais com as pessoas indicam a necessidade de mais estudos para determinar o papel do cavalo na transmissão da leptospirose (HASHIMOTO et al.; 2007). Identificação de variáveis

que afetam a dinâmica da circulação de leptospiros na população, como fatores ambientais de transmissão, pode contribuir para melhorar o conhecimento da leptospirose urbana e delinear intervenções e políticas de controle para este emergente problema em saúde pública (DIAS et al.; 2008). Um estudo experimental com infecção de *Leptospira interrogans* sorovar Kinnenwicki demonstrou que cavalos podem apresentar leptospiremia de 2 a 6 dias após infecção e leptospirúria 4 semanas após infecção, demonstrando que cavalos podem disseminar a doença (YAN et al.; 2010).

O teste padrão para o diagnóstico de leptospirose é a soro aglutinação microscópica (SAM), que detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* spp. (WHO, 2003). Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) pode ser usado para detectar ácidos nucleicos leptospiros patogênicos, através do gene da proteína LipL32, presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* spp. (STODDARD et al.; 2009).

Aproximadamente 1.500 cavalos carroceiros, que não tem acesso a cuidados veterinários, diariamente circulam por Curitiba para recolher material reciclável. Portanto, este estudo tem por objetivo investigar a prevalência de *Leptospira* spp. e a ocorrência de leptospirúria e leptospiremia em cavalos da Vila Pantanal, Curitiba, Paraná, considerada endêmica para leptospirose, onde encontramos fatores de risco para leptospirose como esgoto a céu aberto, acúmulo de lixo, inundações, presença de ratos e convívio de várias espécies animais como porcos, galinhas, cães, gatos, cavalos e cabras.

Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias de infraestrutura são pobres, próximos a lixo, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados, proximidade com outras espécies animais, constituem uma população com risco particular para leptospirose (BARWICK et al., 1997). O lugar onde este estudo foi realizado apresenta essas características, de modo que os cavalos estudados constituem uma população de risco para a doença.

4.4 Material e Métodos

Três amostragens foram realizadas totalizando 67 amostras em 62 cavalos utilizados para coleta de material reciclável e domiciliados numa área endêmica para leptospirose humana, Vila Pantanal, Curitiba, Paraná, Brasil. A Vila Pantanal é situada numa área de ocupação irregular, dentro da Área de Conservação do Iguaçu, e apresenta condições sanitárias pobres, acúmulo de lixo e inundações (MORIKAWA, 2010). Nas duas primeiras amostragens (outubro de 2009 e maio de 2010) foi realizado levantamento sorológico e, tendo em vista os resultados, uma terceira amostragem foi realizada (novembro de 2010) com coleta de urina, sangue total e soro. Foram coletadas 25 e 20 amostras de soro na primeira e segunda amostragem, respectivamente. Na terceira amostragem, 22 amostras de soro, sangue total e urina foram coletadas. Três cavalos participaram de duas amostragens e outro de todas as três. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação a 1207 g por 10 minutos, utilizando – se centrífuga Parsec[®] modelo CT 0603. SAM foi realizada em todas as amostras contra 15 sorovares. Amostras de sangue total foram utilizadas para obtenção dos seguintes dados laboratoriais: volume globular (VG), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio. O VG foi obtido utilizando microtubos capilares, microcentrífuga e cartão para leitura de hematócrito; os valores de PPT foram obtidos usando refratômetro; e fibrinogênio utilizando refratômetro portátil para determinação de proteína em soro e densidade em urina e banho Maria a 56 ° por 3 minutos. (LOPES, BIONDO e SANTOS, 2007). Para obtenção de amostras de urina os animais foram sedados com acepromazina (Acepran[®]), intravenosa na dose de 0,05 mg / Kg . Para o procedimento de coleta, utilizou-se sonda nasogástrica humana de cloreto de polivinila marca Medsonda[®], seringa e cloridrato de lidocaína gel 2 %, para lubrificação. Para machos utilizou-se sonda longa, 110 centímetros, número 16 e para fêmeas sonda curta, 40 centímetros, número 16.

As amostras de soro foram diluídas inicialmente a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.900 µL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7,2. Em microplacas distribuiu-se 50 µL do soro diluído e adicionou-se 50 µL dos sorovares, duplicando a diluição inicial (100). O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de controle negativo (FAINE et al., 1999), e as amostras foram testadas contra

15 sorovares: Bratislava, Castellonis, Canicola, Djasiman, Gryppotifosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Hardjo prajitno, Hardjo miniswajizak, Hardjo C. T. G., Hardjo bovis, Wolffi e Tarassovi . Títulos maiores ou iguais a 100 foram consideradas reagentes (RADOSTITIS et al., 2002). A qPCR foi realizada em 22 amostras de sangue total, soro e urina na tentativa de se detectar o ácido nucléico das leptospiros.

Um questionário sobre dados epidemiológicos, validado pela WHO, foi aplicado aos proprietários dos cavalos na terceira amostragem para avaliar o risco de infecção por leptospiros. Dados de pluviosidade de 30 dias antes de cada amostragem foram obtidos no INMET (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2011) .

Foi utilizado teste estatístico de Fischer para os dados laboratoriais e o questionário. Foi aplicada regressão linear para sorologia e pluviosidade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná.

4.5 Resultados e Discussão

Os resultados do levantamento sorológico, de acordo com o sorovar, encontram-se na tabela 02. A prevalência total foi de 47/62 (75,8%) com o sorovar Icterohaemorrhagiae em 38/47 (80,8%) dos cavalos. A prevalência por amostragem foi de 25/25 (100%) cavalos na primeira, 12/20 (60%) na segunda e 15/22 (68,18%) na terceira amostragem. Não foram detectadas amostras positivas (sangue ou urina) para *Leptospira* spp. pelo diagnóstico molecular. Três animais participaram de duas amostragens e um animal de três amostragens. O intervalo entre a primeira e a segunda visita foi 7 meses e entre a segunda e a terceira 6 meses. Houve variações nos títulos, mas nenhum animal se tornou não reagente (tabela 03).

A média dos testes laboratoriais para cavalos reagentes e não reagentes, respectivamente, na terceira visita, foram: PPT $7,76 \pm 0,68$ e $7,77 \pm 0,62$ g/dL; fibrinogênio $473,33 \pm 237,95$ e $400 \pm 239,04$ mg/dL; VG $39 \pm 0,07$ % e $37 \pm 0,08$ %. Não houve diferença entre os valores de PPT ($p = 0,28$), fibrinogênio ($p = 0,09$) e VG ($p = 0,13$) de animais reagentes e não reagentes. Os resultados do questionário sobre dados epidemiológicos encontram-se na tabela 04.

A pluviosidade 30 dias antes da primeira, segunda e terceira amostragem foi, respectivamente: 304, 222 e 74 mm. Quando comparadas sorologia e pluviosidade, uma correlação positiva é observada ($p = 0,03$): quanto maior a pluviosidade maior a sorologia.

Tabela 02 – Prevalência de *Leptospira* spp.de acordo com o sorovar Curitiba – PR, 2012.

Amostragem	01	02	03
Sorovar	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Prevalence	64% (16/25)	45% (9/20)	50% (11/22)
Sorovar	Canicola, Icterohaemorrhagiae	Canicola, Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Castellonis
Prevalência	4% (1/ 25)	5% (1/20)	13,63% (3/22)
Sorovar	Bratislava	Bratislava	Icterohaemorrhagiae, Castellonis e Pyrogenes
Prevalência	8% (2/ 25)	5% (1/20)	4,50% (1/22)
Sorovar	Canicola	Gryppothiposa	
Prevalência	8% (2/ 25)	5% (1/20)	
Sorovar	Canicola, Pyrogenes, Hardjo pratijino		
Prevalência	4% (1/ 25)		
Sorovar	Canicola, Pyrogenes		
Prevalência	4% (1/25)		
Sorovar	Bratislava, Icterohaemorrhagiae		
Prevalência	4% (1/25)		
Sorovar	Pomona		
Prevalência	4% (1/25)		

Tabela 03 – Titulação dos animais que participaram de mais de uma coleta, Vila Pantanal, Curitiba-PR, 2012.

Animal	Colheita 01	Colheita 02	Colheita 03
01	400 Icterohaemorrhagiae	400 Icterohaemorrhagiae	Não realizada
02	200 Icterohaemorrhagiae	400 Icterohaemorrhagiae	400 Icterohaemorrhagiae
03	400 Icterohaemorrhagiae	Não realizada	200 Icterohaemorrhagiae, 100 Castellonis
04	Não realizada	400 Icterohaemorrhagiae	400 Icterohaemorrhagiae

Tabela 04 – Questionário epidemiológico para *Leptospira* spp. em 22 cavalos carroceiros de Curitiba – PR, Brasil, 2011.

	Novembro 2010		
	Reagente	Não reagente	p
Contato com sujeira, lixo e esgoto			
Sim	9 (60%)	3(42,86 %)	0,27
Não	6 (40%)	4 (57,14%)	
Casa localizada a menos de 20 metros do acúmulo de lixo			
Sim	9 (60%)	6 (85,71%)	0,20
Não	6 (40%)	1 (14,29%)	
Casa localizada a menos de 10 metros de esgoto a céu aberto			
Sim	11 (73,33%)	5 (71,43%)	0,38
Não	4 (26,67%)	2 (28,57%)	
Presença de ratos próximo a residência			
Sim	14 (93,33%)	4 (57,14%)	0,07
Não	1 (6,67%)	3 (42,86%)	
Inundações próximas a residência			
Sim	8 (53,33%)	0	0,02
Não	7 (46,67%)	7 (100%)	

Uma prevalência total de 47/62 (75,8%) com o sorovar Icterohaemorrhagiae em 38/47 (80,8%) cavalos foi encontrada no presente estudo e pode ser considerada alta se comparada a outras pesquisas, incluindo: 757/1402 (54%) nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás utilizando cavalos de esporte e trabalho (LANGONI et al.,2004), 82/182 (45%) também em Goiás (LINHARES et al., 2005). Prevalência de 214/320 (66,88%) foi demonstrada em cavalos carroceiros sem sinais clínicos

associados a leptospirose em estudo realizado na área urbana de Londrina – PR pela SAM (HASHIMOTO et al., 2007). Os cavalos do presente estudo provavelmente estejam mais expostos ao contato e infecção por leptospirosas devido ao ambiente e suas condições de saúde, por isso uma maior prevalência foi observada.

Avaliando os cavalos que foram amostrados mais de uma vez, observa-se que o cavalo número 02 aumentou o título para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* entre a primeira e segunda coleta, mantendo – o na terceira. O cavalo número 03 demonstrou titulação menor para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* quando comparadas primeira e terceira amostragens (13 meses de intervalo), mas reagiu para o sorovar *Castellonis* antes não reagente. Os animais 01 e 04 mantiveram seus títulos e sorovares entre as coletas. É importante ressaltar que esses quatro animais pertenciam ao mesmo proprietário e dividiam o mesmo ambiente. O título de cavalos infectados experimentalmente apareceu 5 a 6 dias após a infecção, com o pico ocorrendo no 14^o dia. Após isso houve um declínio no título, desaparecendo entre 40 e 60 dias após infecção (YAN et al., 2010). O intervalo entre as amostragens foi maior (6 e 7 meses) do que o período de 40 a 60 dias para desaparecimento do título, o que demonstra que os cavalos se mantiveram reagentes provavelmente pelo contato constante com leptospirosas do ambiente. Ainda no estudo com infecção experimental, leptospiúria foi demonstrada por microscopia de campo escuro e cultura 4 semanas após a infecção; e leptospiremia por hemocultura entre 3 e 6 dias após infecção. Leptospiúria e leptospiremia foram observadas apenas nos animais infectados com 10×10^8 leptospirosas via ocular e intraperitoneal; o mesmo não ocorreu com animais infectados com 5×10^8 leptospirosas por via ocular e subcutânea (YAN et al., 2010). O fato de, no presente estudo, o diagnóstico não ter demonstrado leptospiúria ou leptospiremia possivelmente ocorreu porque a amostragem não foi realizada numa fase aguda de infecção. Não há dados sobre quantidade de *Leptospira* spp. que poderia ter infectado os cavalos do presente estudo nem a via de infecção, fatores que poderiam influenciar a ocorrência de leptospiúria e leptospiremia.

Analisando o questionário (Tabela 04), fica evidente que inundações são um risco para leptospirose, pois mais proprietários de animais reagentes relataram a ocorrência de inundações próximos a residência.

Testes laboratoriais (VG, PPT e fibrinogênio) não são afetados por sorologia positiva para *Leptospira* spp. Estudo com infecção experimental em cavalos demonstrou que os animais infectados com 10×10^8 leptospiras por via intraperitoneal e intra ocular tiveram anemia, mas o mesmo não ocorreu com os cavalos infectados com 5×10^8 leptospiras por via intra ocular e subcutânea. Os cavalos não apresentaram alterações no fibrinogênio (YAN et al., 2010). Possivelmente, via de infecção e quantidade de microorganismos infectantes possam influenciar a ocorrência de alterações laboratoriais.

A correlação positiva entre sorologia e pluviosidade também foi observada em um estudo com cães na mesma área do presente estudo (MORIKAWA, 2010).

4.6 Conclusão

Embora cavalos carroceiros possam estar constantemente expostos a *Leptospira* spp. no ambiente, principalmente por chuvas e inundações, leptospiremia e leptospirúria não foram observadas no presente estudo por qPCR. Aumento na pluviosidade e inundações são fatores de risco para o contato de cavalos com *Leptospira* spp. Volume globular, proteína plasmática total e fibrinogênio podem não ser afetados pela infecção por *Leptospira* spp.

REFERÊNCIAS:

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A de La Peña. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. v.140, p. 287-296, 2010.

BARWICK RS, MOHAMMED HO, MCDONOUGH PL, WHITE ME. Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p.1097-1103, 1997.

DIAS, J. P.; TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; MENDES ,C.M.C.; GUIMARÃES, P.; REIS, M.G.; KO, A.; BARRETO, M.L. Fatores associados á infecção por *Leptospira* sp. em um grande centro urbano do Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40 ,n.5,p. 499-504,2008.

FAINE, S., ADLER, B., BOEIN, C., PEROLAT, P., 1999. **Leptospira and Leptospirosis**. 2.ed., MedSci, Melbourne, Austrália.

HASHIMOTO, V.Y.; GONÇALVES, D.D.; SILVA, F.G.; OLIVEIRA, R.C.; ALVES, L.A.; REICHMANN, P.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**.v. 49, n.5, p.327-330,2007.

HOUWERS, D.J.; GORIS, M.G.A.; KAS, J.A.; van DONGEN, A.M.; WESTERDUIN,F.E.; HASTSKEERL,R.A. Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. Letter to the Editor, *Veterinary Microbiology*,v. 148,p.449-451, 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Sinopse do Censo Demográfico 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.

Instituto Nacional de Metereologia. Disponível em: www.inmet.gov.br. Acesso em: agosto, 2011.

LANGONI, H.; da SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; de LIMA, V.Y. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **The Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases**. v.10, n. 3,p. 207-218, 2004.

LARA, M.C.C.S.; FURMAN, K.E.; BARROS FILHO, I.R.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, S.E.M.; DECONTO, I.; BONACIM, J.; UTIME, R.A.; BIONDO, A.W. Detection of Antibodies against Equine Viral Arteritis Virus (Evav) and Equine Herpesvirus Type 1 (Ehv-1) In Cart Horses from Curitiba and Surroundings, Southern Brazil. **Archives of Veterinary Science**.v.11,p. 11-14, 2006.

LINHARES, G.F.C.; GIRIO, R.J.S.; LINHARES, D.C.L.; MONDEIROS, L.C.; OLIVEIRA, A.P. Á. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas prevalências em Cavalos da Microrregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**. v.6, n.4,p. 255-259, 2005.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A. P. Manual de Patologia Clínica Veterinária. 3 ed.; 107p.; Santa Maria, 2007.

MORIKAWA, V.M. **Estudo Sorológico da Infecção por *Leptospira* spp. Em uma Área de Ocupação Irregular e de Alto Risco para a Doença em Cães em Curitiba, PR.** 72 P.Dissertação Mestrado (Pós Graduação em Ciências Veterinárias),Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PIRES NETO, J.A.S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M.A.M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**. v. 2, p.165-176,2005.

RADOSTITIS, O. M.; GAY,C. C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária – **Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9 ed., ed. Guanabara Koogan, 2002.

Secretaria do Estado da Saúde do Paraná/ SESA-PR. Divisão de Zoonoses. **Banco de Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação / SINAN** 2012. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

STODDARD, R.A.; GEEA, J.E.; WILKINSA, P.P.;MCCAUSTLANDB, K.; HOFFMASTERA, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 64, p.247-55, 2009.

YAN, W.; FAISAL, S.M.; DIVERS, T.; McDONOUGH, S.P.; AKEY, B.; CHANG, Y.F. Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kinnewicki Infection of Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24,n. 4,p. 912-7, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Disponível em: www.who.int

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de leptospiremia e leptospirúria não terem sido detectadas neste estudo, não é possível descartar a hipótese de que cavalos carroceiros atuem na disseminação da leptospirose urbana.

A prevalência de *Leptospira* spp. encontrada em cavalos carroceiros no município de Pinhais foi menor do que na Vila Pantanal, bairro da capital Curitiba, assim como ocorre com o número de casos notificados em pessoas. Possivelmente isso se deve ao fato de cavalos e pessoas dividirem o mesmo ambiente. No município de Pinhais – PR há um acompanhamento periódico pelo projeto de extensão universitária Carroceiro por dois anos, o que talvez possa ter contribuído para uma melhora nas condições sanitárias dos cavalos e consequente menor infecção por *Leptospira* spp.

Deste modo, cavalos carroceiros podem servir de sentinelas para alertar sobre a presença de *Leptospira* spp. no ambiente urbano e mesmo, ser fator importante para a ocorrência de surtos de leptospirose humana.

6 APÊNDICES

6.1 Questionário epidemiológico para *Leptospira* spp. na Vila Pantanal

Animal:

Nome do proprietário:

Ficha:

Endereço:

Nº:

Bairro:

Cidade:

Telefone para contato:

Profissão:

Qual é a renda domiciliar?

O animal tem contato com lama, lixo ou esgoto?

Domicílio a menos de 20 metros do acúmulo de lixo?

Há outros animais no domicílio?

Quais?

Residência a menos de 10 metros do esgoto aberto?

Relato de ratos?

Exposição a ambiente contaminado no trabalho?

Ocorrência de enchentes/ alagamentos?

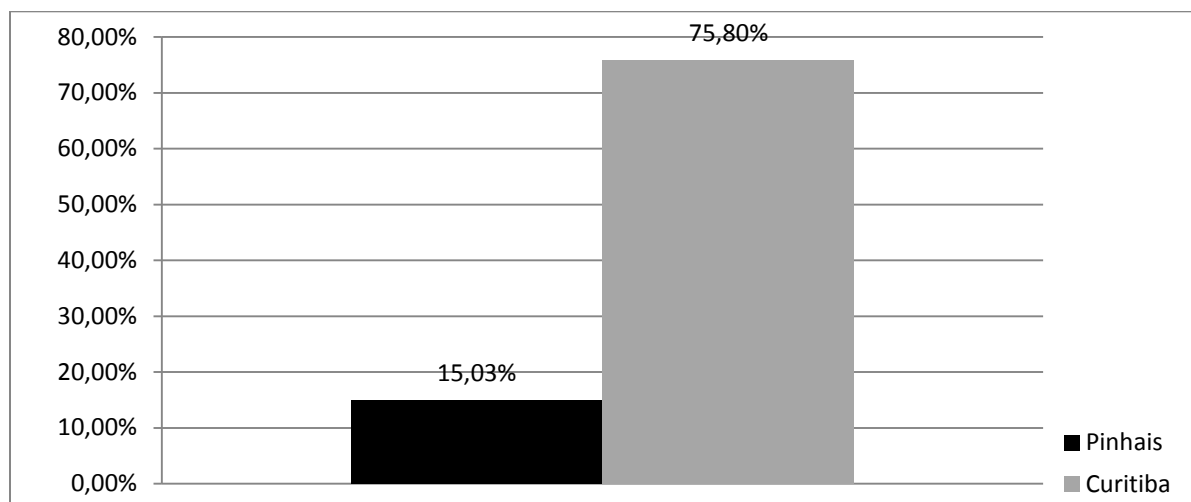
Histórico de aborto?

Quantas vezes?

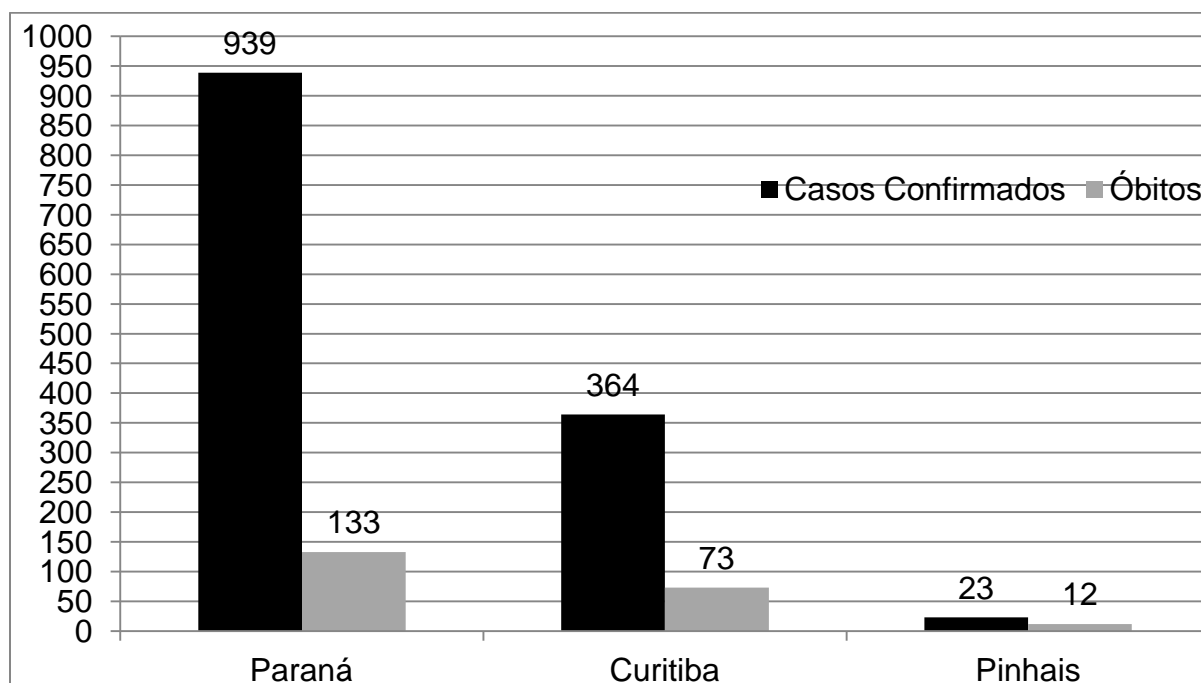
Qual período da gestação?

Observação de problemas oculares?

6.2 Prevalência de *Leptospira* spp. em cavalos carroceiros em Pinhais e Curitiba- PR, 2012.



6.3 Casos humanos de leptospirose confirmados e óbitos no período de 2009 a 2011 no Paraná, 2012.



SINAN, 2012

6.4 Foto da Vila Pantanal, Curitiba, Paraná.



6.5 Foto da Vila Pantanal, Curitiba, Paraná.



Alexander Welker Biondo, 2010.

6.6 Quadro com SAM e qPCR para *Leptospira* spp. de cavalos carroceiros de Pinhais – PR, 2012.

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	qPCR	
							sangue	urina
1	1	NR						
1	2	NR						
1	3	NR						
1	4	NR						
1	5	NR						
1	6	NR						
1	7	NR						
1	8	NR						
1	9	NR						
1	10	NR						
1	11	NR						
1	12	NR						
1	13	NR						
1	14	NR						
1	15	NR						
1	16	NR						
1	17	NR						
1	18	NR						
1	19	NR						
1	20	R	100	Pomona				
1	21	NR						
1	22	NR						
1	23	NR						
2	24	R	800	Pomona				
2	25	NR						
2	26	NR						
2	27	NR						
2	28	NR						
2	29	NR						
2	30	NR						
2	31	NR						
2	32	NR						
2	33	NR						
2	34	NR						
2	35	NR						
2	36	NR						
2	37	NR						

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	sangue	urina
2	38	NR						
2	39	NR						
2	40	R	200	Djasiman	100	Copenhageni		
2	41	NR						
2	42	NR						
2	43	R	100	Pomona				
2	44	NR						
2	45	NR						
2	46	R	100	Djasiman				
2	47	NR						
2	48	R	400	Pomona				
2	49	NR						
2	50	NR						
2	51	NR						
2	52	NR						
2	53	NR						
2	54	NR						
2	55	NR						
2	56	R	200	Pomona				
2	57	NR						
2	58	NR						
2	59	NR						
2	60	NR						
2	61	NR						
2	62	NR						
2	63	NR						
2	64	R	100	Pomona				
2	65	NR						
2	66	NR						
2	67	NR						
2	68	NR						
2	69	NR						
2	70	NR						
2	71	NR						
2	72	NR						
2	73	R	100	Djasiman				
2	74	NR						
2	75	NR						
2	76	R	100	Pomona				
2	77	R	100	Pomona				

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	sangue	urina
2	78	NR						
2	79	R	100	Pomona				
2	80	NR						
2	81	NR						
2	82	NR						
3	83	NR					x	x
3	84	NR					x	x
3	85	NR					x	x
3	86	NR					x	
3	87	NR					x	
3	88	NR					x	x
3	89	NR					x	x
3	90	R	100	Hardjo CTG			x	
3	91	NR					x	x
3	92	NR					x	
3	93	NR					x	
3	94	R	3200	Pomona			x	
3	95	NR					x	x
3	96	NR					x	x
3	97	NR					x	x
3	98	NR					x	
3	99	NR					x	
3	100	NR						x
3	101	R	100	Canicola			x	x
3	102	NR					x	x
3	103	NR					x	
3	104	R	100	Pomona			x	x
3	105	R	100	Icterohaemorrhagiae			x	
3	106	R	200	Canicola			x	x
3	107	NR					x	x
3	108	NR					x	x
3	109	NR					x	
3	110	NR					x	x
3	111	NR						
3	112	NR					x	x
3	113	NR					x	
4	114	NR						
4	115	NR						
4	116	NR						
4	117	NR						

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	sangue	urina
4	118	NR						
4	119	NR						
4	120	NR						
4	121	NR						
4	122	NR						
4	123	R	200	Grippotyphosa	100	Hardjo CTG		
4	124	NR						
4	125	NR						
4	126	R	100	Grippotyphosa				
4	127	NR						
4	128	NR						
4	129	R	200	Icterohaemorrhagiae	100	Canicola		
4	130	NR						
4	131	NR						
4	132	NR						
4	133	NR						
4	134	NR						
4	135	NR						
4	136	NR						
4	137	R	200	Icterohaemorrhagiae				
4	138	NR						
4	139	NR						
4	140	NR						
4	141	NR						
4	142	NR						
4	143	NR						
4	144	NR						
4	145	NR						
4	146	NR						
4	147	NR						
4	148	NR						
4	149	NR						
4	150	NR						
4	151	NR						
4	152	R	100	Canicola				
4	153	NR						

R= reagente; NR =não reagente; x = negativo

6.7 Quadro com SAM e qPCR para *Leptospira* spp. de cavalos carroceiros de Curitiba– PR, 2012.

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	SAM	sorovar	qPCR	
									sangue	urina
1	1	R	800	Canicola	400	Icterohaemorrhagiae				
1	2	R	200	Icterohaemorrhagiae						
1	3	R	400	Icterohaemorrhagiae						
1	4	R	400	Icterohaemorrhagiae						
1	5	R	200	Icterohaemorrhagiae						
1	6	R	400	Icterohaemorrhagiae						
1	7	R	800	Icterohaemorrhagiae	200	Bratislava				
1	8	R	200	Canicola	100	Pyrogenes				
1	9	R	200	Pomona						
1	10	R	200	Icterohaemorrhagiae						
1	11	R	800	Icterohaemorrhagiae						
1	12	R	800	Icterohaemorrhagiae						
1	13	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	14	R	400	Icterohaemorrhagiae						
1	15	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	16	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	17	R	200	Canicola						
1	18	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	19	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	20	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	21	R	100	Icterohaemorrhagiae						
1	22	R	100	Bratislava						
1	23	R	3200	Canicola	200	Pyrogenes	100	Hardjo pratijino		
1	24	R	200	Bratislava						
1	25	R	100	Canicola						
2	26	R	400	Icterohaemorrhagiae						

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	SAM	sorovar	sangue	urina
2	27	R	400	Icterohaemorrhagiae						
2	28	R	100	Icterohaemorrhagiae						
2	29	R	400	Icterohaemorrhagiae						
2	30	R	1600	Icterohaemorrhagiae						
2	31	R	200	Icterohaemorrhagiae						
2	32	R	100	Canicola	100	Icterohaemorrhagiae				
2	33	NR								
2	34	NR	400	Gryppothiphosa						
2	35	NR								
2	36	NR								
2	37	NR								
2	38	R	100	Bratislava						
2	39	NR								
2	40	NR								
2	41	R	100	Icterohaemorrhagiae						
2	42	R	400	Icterohaemorrhagiae						
2	43	R	400	Icterohaemorrhagiae						
2	44	NR								
2	45	NR								
3	46	R	200	Icterohaemorrhagiae	100	Castellonis			x	x
3	47	R	400	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	48	R	400	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	49	NR							x	x
3	50	R	100	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	51	R	100	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	52	NR							x	x
3	53	R	100	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	54	R	100	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	55	R	100	Icterohaemorrhagiae					x	x

Coleta	Amostra	Sorologia	SAM	sorovar	SAM	sorovar	SAM	sorovar	sangue	urina
3	56	R	200	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	57	NR							x	x
3	58	R	200	Icterohaemorrhagiae	100	Castellonis			x	x
3	59	R	200	Icterohaemorrhagiae	200	Castellonis	100	Pyrogenes	x	x
3	60	NR	200	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	61	NR	100	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	62	NR							x	x
3	63	NR							x	x
3	64	R	200	Icterohaemorrhagiae					x	x
3	65	NR							x	x
3	66	NR							x	x
3	67	NR							x	x
3	68	R	200	Icterohaemorrhagiae					x	x

R= reagente; NR =não reagente; x = negativo

7- ANEXOS

7.1 Resumo apresentado no 18 ° EVINCI – UFPR, Curitiba, PR, 2010.

0833 DETECÇÃO DE *Leptospira* POR PCR, EM URINA DE CAVALOS DE CARROCEIROS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

Aluno de Iniciação Científica: Ana Paula Marinho (IC - Voluntária)

Nº de Registro do Projeto de Pesquisa no BANPESQ/THALES: 2009023728

Orientador: Ivan Deconto

Co-Orientador: Alexander Welker Biondo

Colaborador: Mariane A.P.Finger, Leila S. Ullmann, Raquel Pampuch, Cristiane da C. de Barros, Vivien M. Morikawa, Ivan R. de Barros Filho, Hélio

Departamento: Medicina Veterinária Setor: Ciências Agrárias

Palavras-chave: carroceiros, leptospirose, cavalos

Área de Conhecimento: 4.06.02.00-1- Saúde Pública

A leptospirose equina se manifesta principalmente de forma subclínica ou por abortos e/ou uveíte recorrente. Os equinos podem apresentar uma fase de leptospiúria, eliminando *Leptospiras* na urina, podendo ser potenciais disseminadores da doença pelo ambiente, principalmente os cavalos de carroceiros que percorrem longas distâncias todos os dias coletando material reciclável e vivem em condições sanitárias precárias. O presente trabalho tem como objetivo o levantamento de dados de equinos positivos para leptospirose no município de Curitiba e região metropolitana para posterior aplicação da técnica molecular PCR, na urina dos mesmos com o objetivo de detectar a presença de DNA de *Leptospiras* e desenvolver um perfil epidemiológico da doença em cavalos de carroceiros. Em 2010 foram coletadas 60 amostras de sangue da veia jugular de cavalos carroceiros dos municípios de Pinhais e Curitiba (Bairro Vila Pantanal) em atividades pontuais chamadas "Dia do Carroceiro". O soro dos cavalos, sendo 40 do município de Pinhais e 20 de Curitiba, foi enviado para o laboratório de Zoonoses da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP) campus Botucatu para pesquisa de aglutininas anti-*Leptospiras* através da reação de soromicroaglutinação microscópica (SAM), o método ouro para diagnóstico da doença. Considerou-se amostra positiva aquela que apresentou aglutinação igual ou superior a 1/100. Dos 40 cavalos de Pinhais, 25% (10) foram positivos, sendo 10 para os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e um para o sorovar *Canicola*. Das 20 amostras da Vila Pantanal, 60% (12) foram positivas, sendo 10 para *Icterohaemorrhagiae*, um para *Gryppothiphosa*, um para *Canicola* e um para *Bratislava*. Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias e de infra-estrutura são precárias, como os cavalos carroceiros se contituem uma população de risco. Os resultados são preocupantes no aspecto de saúde pública, pois trata-se de uma zoonose e os cavalos de tração por serem ferramentas de trabalho e estarem em contato íntimo com humanos e outras espécies animais, podem estar contribuindo na disseminação da doença e ter um papel importante no ciclo epidemiológico da leptospirose.

7.2 – Resumo apresentado no 19º EVINCI – UFPR, Curitiba, PR, 2011.

0890 DETECÇÃO DE *LEPTOSPIRA* POR PCR, EM URINA DE CAVALOS DE CARROCEIROS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

Aluno de Iniciação Científica: Ana Paula Marinho (IC – Voluntária)

Nº de Registro do Projeto de Pesquisa no BANPESQ/THALES: 2009023728

Orientador: Ivan Deconto

Co-Orientador: Alexander Welker Blundo

Colaborador: Marlane Angélica Pommerening Finger (MESTRADO-UFPR), Ivan Roque de Barros Filho (DOCENTE-UFPR), Peterson Triches Dornbush (DOCENTE-UFPR)

Departamento: Medicina Veterinária

Setor: Ciências Agrárias

Palavras-chave: *Leptospira* spp., cavalos carroceiros, qPCR

Área de Conhecimento: 4.06.02.00-1

No Brasil, a leptospirose é considerada uma doença endêmica e representa um sério risco à saúde pública. Atualmente, os cavalos constituem uma fauna urbana emergente e são utilizados como animais de tração de carroças na coleta de materiais recicláveis nos centros urbanos. Foram realizadas três colheitas de sangue utilizando 61 cavalos carroceiros em região endêmica para leptospirose humana, na Vila Pantanal, Curitiba-PR. Nas duas primeiras colheitas (outubro de 2009 e maio de 2010) realizou-se um inquérito sorológico e do sangue total foi obtido hematócrito (Ht), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio, tendo em vista os resultados obtidos, uma terceira colheita (novembro de 2010) de sangue e também urina, através de cateterização uretral foi executada para fins de diagnóstico molecular e um questionário referente a dados epidemiológicos foi aplicado aos proprietários dos animais para se avaliar o risco de infecção por leptospiros. A sorologia foi realizada pela soro aglutinação microscópica (SAM) e o diagnóstico molecular pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR). No total 25/25 (100%) reagiram a algum sorovar de *Leptospira* spp. na primeira colheita; 12/20 (60%) na segunda e 15/22 (68,18%) na terceira. O sorovar mais prevalente foi o Icterohaemorrhagiae. Nenhum animal foi positivo pela qPCR no sangue total, soro ou urina. Três animais participaram de duas coletas e um animal participou das três coletas. O intervalo entre a primeira e segunda colheita foi de 7 meses e entre a segunda e terceira 8 meses. Observou-se variação no título, mas nenhum animal tornou-se não reagente. Quanto ao questionário epidemiológico, dos proprietários de animais soro reagentes na terceira colheita, 9/15 (60%) afirmaram que o animal tem contato com lama, lixo e esgoto e que o domicílio fica a menos de 20 metros de acúmulo de lixo; 11/15 (73,33%) afirmaram que sua residência está localizada a menos de 10 metros do esgoto aberto; 14/15 (93,33%) relataram a presença de ratos próximo ao domicílio. Não houve diferença estatística, pelo teste t de Student, para as questões abordadas. Nenhum proprietário de animal soro reagente relatou ocorrência de abortos ou problemas oculares nos cavalos. As prevalências encontradas são altas se comparadas à literatura. Os cavalos carroceiros estudados estão constantemente expostos as leptospiros presentes no ambiente e pelo sorovar mais frequentemente encontrado, podendo-se inferir que os roedores são a principal fonte de infecção. Os cavalos podem estar atuando como sentinelas para a presença de leptospiros no ambiente.

7.3 - Resumo apresentado no 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis – SC, 2011.

**SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS AND LABORATORY
PROFILE IN CART HORSES FROM CURITIBA, PARANÁ
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEPTOSPIROSE E PERFIL
LABORATORIAL EM CAVALOS DE CARROCEIROS DE CURITIBA, PARANÁ**

Mariane Angélica Pommerening Finger^{1*}, Mariana Yumi Takahashi Kamoi², Pedro Irineu Teider Junior², Mariana Kikuti³, Leila Sabrina Ullmann⁴, Helio Langoni⁵, Ivan Roque de Barros Filho⁶, Ivan Deconto⁶, Peterson Triches Dornbush⁶, Alexander Welker Biondo⁶

*Autor para correspondência: Mariane Angélica Pommerening Finger. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua dos Funcionários, 1540 – Juvevê, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brasil. Tel.: +55 41 3350 5734 Fax +55 41 3350-5623. E-mail: mari.finger.ufpr@gmail.com.

Summary

Leptospirosis is an endemic zoonotic disease of serious public health risk in Brazil. Currently, cart horses are an emerging urban population used as animal traction for carrying recyclable material and transit through urban centers. Two samplings in cart horses from an endemic area for leptospirosis at the Vila Pantanal, Curitiba –PR were performed with a total of 42 samples. Serology was performed by microscopic agglutination test (MAT). Overall 27/42 (64.28%) samples were reagent to at least one serovar of *Leptospira* spp. The most prevalent serovar was Icterohaemorrhagiae in 25/42 (59,52%) samples. Among reagent horses, 9/27 (33.33%) had high total plasmatic protein 12/27 (44.44%) had high fibrinogen and 2/27 (25.92%) were anemic (hematocrit < 32%). Using Chi square and Fisher's test was possible to observe that was no difference between reagent and not reagent horses in MAT.

Key words: *Leptospira* spp., cart horses, hematocrit

Resumo

A leptospirose é uma zoonose endêmica e constitui um sério risco à saúde pública no Brasil. Atualmente, os cavalos constituem uma fauna urbana emergente e são utilizados como animais de tração de carroças de coletores de materiais recicláveis que circulam por centros urbanos. Foram realizadas duas colheitas utilizando um total de 42 cavalos de carroceiros em região endêmica para leptospirose humana, na Vila Pantanal, Curitiba-PR. A sorologia foi realizada pela soroaglutinação microscópica (MAT). No total 27/42 (64,28%) amostras reagiram a algum sorovar de *Leptospira* spp. O sorovar mais prevalente foi o Icterohaemorrhagiae em 25/42 (59,52%) das amostras. Dos reagentes, 9/27 (33,33%) estavam com a proteína plasmática total aumentada, 12/27 (44,44%) com o fibrinogênio aumentado e 2/27 (25,92%) anêmicos (hematócrito <32%). Utilizando o teste do Qui quadrado e teste de Fisher foi possível perceber que não houve diferença entre reagentes e não reagentes no MAT.

Palavras Chaves: *Leptospira* spp., cavalos de tração, hematócrito

¹ Mestranda do Programa de PPGCV, Universidade Federal do Paraná- Curitiba, Paraná

² Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – Curitiba Paraná

³ Residente NUPEZO - DHVSP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- Botocatu, São Paulo

⁴ Doutoranda SASPVSA- IBB, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- Botocatu, São Paulo

⁵ Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista Júlio de

Mesquita Filho- Botocatu, São Paulo

⁶ Docentes do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Paraná

Many horses live in very poor sanitary conditions and have a direct contact with humans, so the study to identify the occurrence of leptospirosis in those animals become important because they allow more effective prevention methods related with public health (RADOSTITIS et al, 2002). Studying possible relation of horse bad nutrition and possibly anemia, and high titers to *Leptospira* spp. it is possible to establish a standard about animal physical conditions and leptospirosis occurrence.

Two collects of blood were performed (May and November 2010) which laboratory and serology were realized. There were 42 cart horses used for collect recyclable material and domiciled in an endemic area for human leptospirosis, Vila Pantanal, Curitiba, Parana State, Brazil. Blood samples were collected with and without anticoagulant (EDTA). The total blood samples were used to obtaining hematocrit (Ht), total plasmatic protein (TPP) and fibrinogen. The hematocrit was determined using Micro hematocrit method (BIRGEL et al., 1982). The evaluation of plasmatic fibrinogen was performed according to Kaneko et al. (1997). The blood samples were tested against 15 serovars: Bratislava, Castellonis, Canicola, Djasiman, Gryppotiphosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Hardjo Prajitno, Hardjo Miniswajizak, Hardjo C. T. G., Hardjo Bovis, Wolffi and Tarassovi. Statistical analysis was performed (Chi Square and Fischer's Test) relating reagent and no reagent animals in MAT with laboratorial exams.

A total of 27/42 (64, 28%) horses reacted for some serovar of *Leptospira* spp. After

correlating serology and laboratorial tests was possible to observe that 9/27 (33%) of reagent animals were dehydrated (TPP > 8.0 g/dL), while 3/15 (20%) nonreagent ones also had a high total protein. High fibrinogen (> 400 mg/ dL) was observed in 12/27 (44.44%) reagent animals indicating a inflammatory process and 2/27 (7.4%) reagent horses were anemic (hematocrit < 32 %). Among not reagent horses, there were 4/15 (26.66%) with high fibrinogen and 7/15 (46.66%) with anemia. There were no difference between reagent and not reagent horses to Ht ($p = 0.17$); TPP ($p = 0.19$) and fibrinogen ($p = 0.14$). A study in horses experimentally infected with *Leptospira* spp. there was no fibrinogen changes (YAN W,2010).

Prevalence of 27/42 (64.28%) found in present study can be considered high compared to other researches, including: 757/1402 (54%) in São Paulo, Mato Grosso do Sul and Goiás State (LANGONI H, 1996-2001) and 871/1169 (74.51%) in Rio Grande do Sul (PIRES NETO et al., 2005). Similar prevalence was found in cart horses from Londrina –PR: 214/320 (66. 88%) (HASHIMOTO et al., 2007).

There was no difference between reagent and not reagent horses in MAT and laboratorial exams in cart horses from Curitiba. It can be inferred that laboratorial exams are not a good parameter to leptospirosis diagnosis.

Referencias Bibliográficas

- BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J et al. Patologia clínica veterinária. São Paulo: SPMV, 1982. 260p.
- HASHIMOTO VY, GONÇALVES DD, SILVA F G, OLIVEIRA RC, ALVES LA, REICHMANN P, MULLER EE, FREITAS JC. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2007,49 (5): 327-33.
- KANEKO, J.J. (1997) Serum proteins and the dysproteinaemias. In: Kaneko J.J., Harvey, J.W. & BRUSS. M.L. (Eds.) Clinical biochemistry of domestic animals, 5th ed. San Diego, Academic Press. p.117-138.
- LANGONI H, DA SILVA AV, PEZERICO SB, DE LIMA VY. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. The Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases, 2004, 10 (3): 207-218
- PIRES NETO JAS, HESSE F, OLIVEIRA MAM. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. Veterinária em Foco, 2005, 2:165 - 176
- RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária– Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9 ed., ed.Guanabara Koogan, 2002.
- YAN W, FAISAL SM, DIVERS T, McDONOUGH SP, AKEY B, CHANG YF. Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kinnewicki Infection of Horses. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2010, 24 (4): 912-7.